

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U

N° 43

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

PAR

Renée DUFAU

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DOSAGE BIOLOGIQUE DU VENIN DE CRAPAUD

JURY

Président : M. GORIS.

Professeur : LAUNOY.

Maître des Conférences : VALETTE.

SOCIÉTÉ DE L'IMPRIMERIE HABAUZIT

AUBENAS (ARDÈCHE)

1940



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DU DOSAGE BIOLOGIQUE
DU VENIN DE CRAPAUD

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U

N° 43

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

PAR

Renée DUFAU

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DOSAGE BIOLOGIQUE DU VENIN DE CRAPAUD

JURY

Président : M. GORIS.

Professeur : LAUNOY.

Maitre des Conférences : VALETTE.

SOCIÉTÉ DE L'IMPRIMERIE HABAUZIT

AUBENAS (ARDECHE)

1940

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. ✱, ① I.

P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱ ① I. Membre de l'Institut.

H. J. LIONNET, *Secrétaire*, ① I.

PROFESSEURS

MM. LEBEAU, O. ✱, ① I.	Membre de l'Institut.	Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱ ① I.		Pharmacie galénique.
DAMIENS, O. ✱ ① I.		Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✱ ① I.		Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ① I.		Chimie organique.
LUTZ, ✱, ① I.		Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ① I.		Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ① I.		Zoologie.
DELABY, ✱, ① I.		Chimie analytique.
PICON, ✱, ① I.		Physique.
MASCRÉ, ✱, ① I.		Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
BACH, ✱, ① I.		Botanique générale.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✱, ① I. — GUÉRIN, O. ✱, ① I.

Professeurs honoraires

MM. BÉHAL, G. O. ✱, ① I. et DELÉPINE, O. ✱, ① I., Membres de l'Institut
 PERROT, C. ✱, ① I., COUTIÈRE, O. ✱, ① I., BOUGAULT, O. ✱, ① I.
 et TASSILLY, O. ✱, ① I.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

FLEURY, ① I.	Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, ✱, ① I.	Minéralogie. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
RÉGNIER, ① I.	Bactériologie.
CHARONNAT, ① I.	Chimie et Pharmacie Chimique
JANOT, ① A.	Pharmacie galénique et biologie végétale.
VALETTE, ① A.	Histoire naturelle.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, ① A.	trav. prat. de 1 ^{re} Année	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER, ① A.	trav. prat. de 2 ^e et 3 ^e année	Chimie analytique.
PARIS, .		Micrographie.
CORRIEZ, ① A.		Physique.
DAVID, ① A.		Microbiologie.
GUILLOT, .		Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ① A.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

EMILE DUFAU

Chevalier de la Légion d'Honneur

Lauréat de l'Académie de Médecine et de la Société de Pharmacie de Paris

Ancien Président de la Société de Pharmacie de Paris

Membre de la Société de Thérapeutique et de la Commission du Codex.

Qui fut mon premier Maître

A MA MÈRE, A MA SŒUR

qui me permirent d'achever ce travail.

Meis et Amicis

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR A GORIS

Officier de la Légion d'Honneur

Membre de l'Académie de Médecine

Directeur de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux de Paris

En témoignage de respectueuse gratitude
pour la bienveillance qu'il nous a témoignée
et le grand honneur qu'il nous a fait en
acceptant de présider cette thèse.

A MONSIEUR LE DOYEN TIFFENEAU
Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine

Notre Maître à la Faculté de Médecine
qui a bien voulu nous accueillir dans son
laboratoire où a été effectué ce travail.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LAUNOY

Officier de la Légion d'Honneur

Qui fut mon Maître à la Faculté de
Pharmacie et qui a bien voulu faire partie
du jury de ce travail.

Hommage de profonde gratitude.

A MONSIEUR GUILLAUME VALETTE
Pharmacien des Hôpitaux
Maître de conférences d'Histoire naturelle
à la Faculté de Pharmacie de Paris

Hommage reconnaissant.

INTRODUCTION

Parmi les divers venins qu'utilise la médecine populaire, le venin de crapaud constitue une panacée connue depuis des siècles. De tous temps, les Chinois ont utilisé le venin de crapaud comme analgésique et antihémorragique, et l'usage de cette substance s'est répandu dans les deux continents ; de nos jours on l'emploie encore fréquemment dans les campagnes d'Argentine pour calmer les algies dentaires et guérir l'herpès.

Dans les pays d'Europe, c'est surtout en Angleterre, avant que WITHERING ait établi l'usage de la digitale, que la poudre de crapaud fut couramment utilisée dans le traitement de l'hydropisie. Elle figurait même dans la pharmacopée de Samuel DALE (1692).

A la fin du XIX^{me} siècle, le venin de crapaud quitta le domaine de la légende, des croyances populaires et de la médecine empirique pour entrer dans celui de l'expérimentation.

En effet, après les travaux de VULPIAN (1852), de PHISALIX et Gabriel BERTRAND en 1893, de nombreux auteurs dans divers pays, ont étudié les propriétés physiologiques de ce venin et les principes cristallisés que l'on en peut extraire. Parmi ces nombreux expérimentateurs, FORNARA en 1877, classe ce produit dans les digitaliques et songe à l'employer en thérapeutique pour ses propriétés tonicardiaques et vasoconstrictrices.

Cherchant à préparer un principe actif, ABEL et MACHT en 1911 extraient la bufagine de *Bufo agua* (= *B. marinus* L.) que MACHT et ROWENTREE expérimentent en clinique à l'Hôpital John Hopkins de Baltimore. Quinze années plus tard, R. WESLEY SCOTT utilise chez l'homme, par voie intraveineuse un autre principe la cino-bufagine isolée par CHEN et JENSEN en 1928. Enfin, tout récemment (1938), LUTEMBACHER étudie au point de vue cardiotonique l'action d'un principe isolé de crapauds d'Algérie qu'il administre par voie intraveineuse. D'autre part, le venin de crapaud paraît présenter l'intérêt qui s'attache aux divers venins comme analgésiques, hémostatiques et stimulants biologiques. Sans envisager ici ses propriétés thérapeutiques, il importait auparavant de pouvoir mettre entre les mains du clinicien une préparation constante. Or, les nombreux chercheurs qui ont étudié le venin au point de vue pharmacodynamique et chimique n'ont pas examiné la question de son étalonnage : un tel problème s'imposait donc.

Les préparations expérimentées par les divers auteurs ne sont pas identiques ; elles peuvent, en première approximation, être classées en deux types : le premier s'obtenant à partir de la sécrétion des glandes principales ou de la peau entière, le second type représentant les divers principes actifs isolés de cette sécrétion. Pour effectuer l'étude de l'étalonnage, nous avons choisi un produit du premier groupe, à savoir la sécrétion des glandes parotoïdes (1) de *Bufo vulgaris* L. (*Bufo bufo* L.) préparée dans des conditions toujours identiques suivant les principes posés par Madame PHISALIX, que nous exposons plus loin.

(1) Ce terme est employé par Madame PHISALIX pour éviter toute confusion regrettable avec les glandes parotides.

A l'aide d'un tel produit, nous avons pu étudier les trois points qu'il convient d'examiner systématiquement dans tout étalonnage biologique.

En premier lieu, nous avons cherché à mettre au point les méthodes empruntées au dosage des cardiotoxiques du règne végétal. Cette étude réalisée, nous avons cherché à mettre au point les méthodes essayées, tant au point de vue de leur fidélité et de leur précision que de leur utilisation pratique. Enfin, nous avons étudié la question du choix et de la stabilité d'un étalon destiné à servir d'élément de comparaison pour le dosage des préparations galéniques à base de venin de crapaud. Ces trois points principaux constituent les trois parties de notre étude.

Ce travail a été exécuté au laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris grâce au bienveillant accueil que m'y a réservé son Directeur Monsieur le Doyen TIFFENEAU.

C'est avec une émotion reconnaissante que j'évoque la mémoire du Docteur BROUN, le regretté chef du laboratoire sous l'égide duquel j'ai entrepris ces recherches.

J'adresse mes remerciements à son successeur, le Docteur Raymond CAHEN qui orienta cette étude et en permit l'achèvement.

Madame MARCOUX m'initia aux techniques de laboratoire et facilita toujours ma tâche par son expérience de la recherche. Je la prie d'agréer l'expression très vive de mes remerciements. La compétence et l'esprit critique de M. Casimir CÉPÈDE, Docteur ès Sciences ont été mis tout amicalement à ma disposition. Il sait que je lui en garde une affectueuse reconnaissance.

PLAN DÉTAILLÉ

INTRODUCTION.

PREMIÈRE PARTIE. — Etude expérimentale de quelques méthodes de dosage biologique de venin.

CHAPITRE PREMIER. — Origine, nature et procédés d'extraction des divers venins de crapaud.

1°. — Origine zoologique et géographique.

2°. — Nature du produit.

3°. — Origine de la sécrétion utilisée.

4°. — Procédés d'extraction.

a) Produits d'expression directe des éléments glandulaires.

b) Produits résultant de l'excitation des lobes

c) Produits résultant de la macération des peaux.

5°. — Origine et nature du produit utilisé dans ce travail

CHAPITRE II. — Méthodes de détermination de la toxicité du venin par perfusion lente.

I. — Perfusion chez le cobaye.

§ 1. — Conditions expérimentales.

1°. — Choix et nombre des animaux.

2°. — Préparation des animaux et mode d'anesthésie.

3°. — Précautions à observer au cours de la perfusion.

4°. — Test de la mort cardiaque.

5°. — Calculs de la dose minimum mortelle.

§ 2. — Résultats expérimentaux.

II. — Perfusion chez le lapin.

§ 1. — Conditions expérimentales.

1°. — Choix et nombre des animaux.

2°. — Mode d'anesthésie.

3°. — Précautions à observer au cours de la perfusion.

4°. — Test de la mort cardiaque.

§ 2. Résultats expérimentaux.

CHAPITRE III. — Méthodes statistiques de dosage biologique du venin.

I. — Méthode statistique de toxicité chez la souris.

§ 1. — Détermination de la toxicité effectuée par voie intrapéritonéale.

1°. — Conditions expérimentales.

- a) race
- b) poids.
- c) sexe.
- d) préparation des animaux.
- e) modalité de l'injection.

2°. — Comportement des souris au cours de l'intoxication.

3°. — Résultats expérimentaux.

- a) Expression des résultats selon SABULO-NYASAKI.
- b) — — — — — TREVAN.
- c) — — — — — BEHRENS, DRAGSTEDT.

§ 2. — Détermination de la toxicité effectuée par voie intraveineuse.

1°. — Conditions expérimentales.

- a) poids et nombre d'animaux.
- b) modalité de l'injection.

2°. — Comportement des souris au cours de l'intoxication.

3°. — Résultats expérimentaux.

II. — Méthodes statistiques de toxicité chez la grenouille.

1°. — Conditions expérimentales.

- a) origine géographique.
- b) poids.
- c) sexe.
- d) nombre.
- e) modalité de l'injection.

2°. — Résultats expérimentaux.

CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE.

DEUXIÈME PARTIE. — Etude de la valeur et de la précision des diverses méthodes de dosage utilisées.

I. — Détermination des écarts expérimentaux.

1°. — Vérification de la constance des résultats fournis par la méthode de perfusion lente.

a) cobaye.

b) lapin.

2°. — Vérification de la constance des résultats fournis par les méthodes de détermination statistique.

Souris a) Voie intrapéritonéale.

b) Voie intraveineuse.

Grenouille

II. — Renseignements fournis par calcul d'erreurs.

1°. — Ecart individuel moyen.

2°. — Erreur maximum 0/0.

III. — Comparaisons des résultats fournis par diverses méthodes.

CONCLUSIONS

TROISIÈME PARTIE. — Etude de la préparation et de la valeur d'un étalon.

I. — Etude de la préparation et du choix de l'étalon.

II. — Titre éventuel de produits commerciaux.

III. — Stabilité de l'étalon.

CONCLUSIONS.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Mise au point des méthodes de titrage biologique du venin.

Valeur et précision des diverses méthodes expérimentées.

Choix d'un étalon destiné au dosage des préparations.

1^{re} PARTIE

Etude expérimentale de quelques méthodes de dosage biologique du venin

Le dosage biologique du venin de crapaud nécessaire à l'étalonnage de ce cardiotonique n'a fait l'objet jusqu'ici que d'un nombre limité de recherches d'ailleurs peu poussées et portant sur des produits très différents.

En 1906, la résistance comparée des diverses espèces animales vis à vis du venin a été abordée par PIEROTTI, qui a constaté notamment que l'animal le plus sensible était le chat, puis le chien pour lequel la dose minimum mortelle est de 4,5 à 5 mg. par kg, tandis que la grenouille tolérait une dose environ sept fois plus forte. Seize ans plus tard, VINCENTE NOVARO, effectuant un travail analogue avec le venin d'un crapaud tropical *Bufo marinus*, observe que la sensibilité la plus grande appartient au pigeon et au cobaye qui succombent à des doses de 15 mg. par kg, administrées en injection unique par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale.

Utilisant une méthode toute différente, la perfusion lente, K. K. CHEN, H. JENSEN, A. LING CHEN en 1928 ont déterminé chez la grenouille, le chat, le chien, la toxicité des substances cristallisées isolées de la sécrétion de divers crapauds.

Devant une littérature aussi peu abondante, il nous a semblé intéressant de reprendre méthodiquement ces déterminations sur un produit de préparation et d'origine toujours identique.

Nous avons choisi à cet effet des méthodes bien éprouvées pour les cardiotoniques du règne végétal et qui nous ont semblé convenir à l'étude d'une substance réputée cardiotonique depuis des temps reculés et comparée aux digitaliques par FARNARA dès 1877.

Au surplus, des travaux récents (WIELAND, CHEN et JENSEN) ont montré l'analogie de structure des principes actifs isolés de ce venin et des produits digitaliques. La bufotaline, entre autres renferme comme la digitaligénine une fonction monoxylactone non saturée et un système tétracyclique analogue à celui de la cholestérine.

La première partie de ce travail comporte un premier chapitre dans lequel nous avons rappelé l'origine du produit utilisé dans nos recherches et détaillé le mode de préparation du soluté destiné à l'essai biologique. Dans les deux chapitres suivants, nous avons décrit des essais effectués par les méthodes de perfusion lente chez le cobaye et le lapin et les méthodes statistiques portant sur la souris et la grenouille.

TABLEAU I

Origine et caractères des divers venins de crapaud

(d'après les travaux de CHEN K. K., JENSEN H., LING CHEN A.)

Espèce zoologique	Origine Géographique	Forme des glandes parotides	Caractères organoleptiques	RÉACTION
<i>Bufo marinus</i> L. (= <i>B. aqua</i>)	Guyane	énormes (vulgo, épaule armée)	jaune d'or	acide
<i>Bufo bufo</i> L. (= <i>B. vulgaris</i> Linnaeus)	Jamaïque			
	Europe, France	rénoïformes	jaune saumon	id.
<i>Bufo viridis</i> Laurenti	Europe, Allemagne	discrètes, ovales	blanc laiteux odeur de gazon	
<i>Bufo formosus</i> Boulenger	Japon	ovale	blanc laiteux	id.
<i>Bufo gargarizans</i> Cantor	Chine	proéminantes	blanc laiteux	id.
<i>Bufo regularis</i> Reuss	Afrique du Sud	rénoïformes	crèmeux	id.
<i>Bufo arenarum</i> Hensel	Uruguay	allongées	blanc laiteux odeur de gazon	id.
<i>Bufo alvarius</i> Girard	Arizona	allongées, renflées	blanc crèmeux	id.
<i>Bufo valliceps</i> Wiegmann		en virgule	blanc jaunâtre	id.
<i>Bufo fowleri</i> Caman	Louisiane	ovale	grisâtre collant	id.
<i>Bufo quercicus</i> Holbrook	id.	ovale	blanc crèmeux odeur de gazon	id.
<i>Bufo americanus</i> Holbrook	Illinois	ovale	blanchâtre	id.

TABLEAU II

Principes actifs et constituants des divers venins de crapaud
(d'après les travaux de CHEN K. K., JENSEN H., LING CHEN A.)

Espèce zoologique	ADRENALINE	CHOLESTÉROL Ch.	Bufagine (B)	Bufotoxine (Bt)	Bufoténine (Bté)
<i>Bufo marinus</i> L.	5,3 "	+	Marino-B	Marino-Bt.	Marino-Bté.
	+ (2)	Ch. + ergosté- rol 4"/o			
<i>Bufo, bufo</i> L. (1)			o	Vulgaro-Bt.	Vulgaro-Bté
<i>Bufo viridis</i> Lau- renti	o	+	Virido-B	Virido-Bt.	Virido-Bté (A) Virido-Bté (B)
<i>Bufo formosus</i> Bou- lenger	+	+	Gamma-B.	Gamma-Bt.	Gamma-Bté.
<i>Bufo gargarizans</i> Cantor	+	+	Cino-B.	Cino-Bt.	Cino-Bté.
<i>Bufo regularis</i> Reuss	4,6 "	+	Regularo-B.	Regularo-Bt.	Regularo-Bté.
<i>Bufo arenarum</i> Hensel	+	+	Areno-B.	Areno-Bt.	Areno-Bté.
<i>Bufo alvarius</i> Girard	o	+	o	Alvaro-Bt.	Alvaro-Bté.
<i>Bufo valliceps</i> Wiegmann	o	+	Vallicepo-B.	Vallicepo-Bt.	Vallicepo-Bté.
<i>Bufo fowleri</i> Caman	o	+	Fowlero-B.	Fowlero-Bt.	Fowlero-Bté.
<i>Bufo quercius</i> Holbrook	o	+	Quercico-B.	Quercico-Bt.	Quercico-Bté.
<i>Bufo americanus</i> Holbrook	o	+	Americano-B.	Americano-Bt.	Americano-Bté.

(1) Ce *Bufo* présente dans son venin du glutathion et de la vitamine C (ZUMMET et DUBOIS FERRIERE).

(2) Présence d'adrénaline d'après MAEFO VIALLI.

CHAPITRE I

ORIGINE, NATURE ET PROCÉDÉS D'EXTRACTION DES DIVERS VENINS DE CRAPAUD

Les résultats obtenus par les auteurs précédemment cités, se sont montrés discordants parce que leur étude a porté sur des produits différents soit par leur origine zoologique et géographique, soit par la nature et l'origine du produit de sécrétion utilisé.

1) Origine zoologique et géographique.

Les divers venins utilisés ont une origine très diverse, l'énumération de leurs caractères différentiels serait fastidieuse. Nous nous bornerons à résumer dans le tableau I, p. 2 l'origine et les caractères des venins, des différentes espèces de Bufonidés étudiées jusqu'à maintenant, en les classant suivant l'origine géographique, les caractères morphologiques de la glande sécrétant le venin ainsi que les caractères organoleptiques et la réaction du produit sécrété.

2) Nature du produit.

Pour une même origine zoologique ou géographique, la nature du produit est encore variable. Certains auteurs ont employé la sécrétion totale fraîche ou desséchée ; les autres ont utilisé les principes cristallisés qu'ils en ont retirés, et dont l'action ne se superpose pas vraisemblablement à celle du venin total.

Dans le tableau II p. 3 nous avons résumé les caractéristiques de composition des diverses sécrétions étudiées jusqu'ici.

3) Origine de la sécrétion utilisée.

Parmi les diverses sécrétions utilisées, on doit encore considérer la nature de la glande sécrétrice qui peut être muqueuse ou granuleuse. Rappelons que la plupart des batraciens possèdent deux sortes de glandes cutanées : « d'une part, les glandes muqueuses petites, nombreuses, toujours isolées les unes des autres, disséminées sur toute la surface du corps et que l'on a comparé aux glandes sudoripares des mammifères ; d'autre part, les glandes granuleuses susceptibles d'acquérir de plus grandes dimensions et de former en certains endroits de la face dorsale de l'animal des groupements saillants divers, dont les plus volumineux sont les glandes parotides situées de chaque côté de la tête entre l'angle postérieur de l'œil et le cou ».

4) Procédés d'extraction.

Ceux-ci sont encore variables. Suivant la technique opératoire, les préparations obtenues par les différents auteurs peuvent se classer en trois groupes.

a) Produits d'expression directe des éléments glandulaires (parotides et pustules) de la face dorsale du corps qui produisent le venin granuleux (Marie PHISALIX, GESSNER, CHEN, JENSEN).

b) Produits obtenus par l'excitation électrique des lobes optiques préalablement dénudés. Ce procédé permet d'obtenir une sécrétion totale : granuleuse et muqueuse (Marie PHISALIX, FORNARA).

c) Produits de macération des peaux. Certains auteurs dépouillent les crapauds et mettent à macérer les peaux dans différents solvants : alcool, éther, eau (FAUST, WIELAND).

5) Origine et nature du produit utilisé dans ce travail.

A) Origine

Le crapaud utilisé dans nos expériences est le *Bufo bufo* L ou *Bufo vulgaris* L, recueilli en France à l'époque du frai (mars) et provenant principalement du Jura et de la Vendée. Les animaux des deux sexes ont été indifféremment utilisés, mais d'une façon générale, il existe chez le crapaud une prédominance numérique du sexe mâle sur le sexe femelle.

La sécrétion utilisée est le venin granuleux retiré des glandes parotides qui présentent chez le *Bufo vulgaris* L, « l'aspect d'un amas réniforme » à grand axe longitudinal ».

Les glandes à venin granuleux de petites dimensions qui apparaissent sur la portion restante de la peau dorsale n'ont pas été utilisées parce que leur sécrétion est trop peu abondante.

B) Nature de la préparation

Les préparations que nous avons utilisées dans nos expériences sont des macérations aqueuses des glandes parotides de crapaud (*Bufo vulgaris* L.) diluées dans le sérum physiologique légèrement hypertonique pour ramener le liquide à injecter à l'isotonicité.

Le soluté injectable se présente sous l'aspect d'un liquide incolore, de saveur amère produisant sur la langue et les lèvres un picotement et un engourdissement comparables à ceux causés, par l'aconit.

Nous avons essayé deux types de préparation : l'une concentrée servant d'étalon, l'autre moins active, dont l'activité a été comparée à celle de l'étalon.

Pour l'essai physiologique, nous avons utilisé le soluté dilué au quart pour la perfusion lente chez le cobaye et le lapin et dilué seulement de moitié pour l'injection dans le sac lymphatique de *Rana temporaria* L. sensible à de très faibles doses ; enfin pour l'expérimentation chez la souris, et *Rana esculenta* L. nous avons injecté le produit non dilué.

CHAPITRE II

MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ PAR PERFUSION LENTE

Aucune recherche systématique n'avait encore été faite pour déterminer une méthode de dosage des préparations de venin de crapaud.

Les essais effectués jusqu'ici ont eu pour but de préciser les propriétés physiologiques des divers venins et sont d'ordre qualitatif, excepté toutefois les travaux de CHEN et de ses collaborateurs. Il nous a donc semblé indispensable d'établir une méthode de dosage susceptible d'être appliquée à l'étalonnage et permettant d'obtenir un produit d'activité constante.

Nous nous sommes adressés à une méthode de toxicité utilisée classiquement pour les digitaliques : la méthode de perfusion lente précise et bien éprouvée au laboratoire (TIFFENEAU, Jeanne LEVY, R. CAHEN et L. LAUNAY). Rappelons que cette méthode consiste essentiellement à établir la plus petite dose de préparation médicamenteuse susceptible d'amener l'arrêt du cœur de l'animal en un temps déterminé. Nous avons appliqué cette méthode de perfusion lente et régulière au cobaye et au lapin.

I. — Cobaye

La méthode de perfusion lente chez le cobaye n'avait jamais été utilisée pour doser le venin de crapaud. Cependant cet animal présente une activité assez constante pour déterminer la toxicité des cardiotoniques et l'expérience a montré qu'il présente une sensibilité assez grande vis à vis du venin de crapaud.

Il nous a donc paru intéressant de l'utiliser dans les expériences de perfusion lente. Nous avons suivi la technique de KNAFFL-LENZ adoptée en France par Mlle LEVY et K. OTTERSTRÖM, CAHEN et LAUNAY.

Sans revenir sur les détails de cette technique bien connue maintenant, nous nous bornerons à rappeler les précautions reconnues indispensables pour réaliser un dosage rigoureux.

1) Conditions expérimentales

1°) *Choix et nombre des animaux.* — Nos séries de cobayes comportent toujours dix animaux, choisis aussi voisins que possible, d'un poids variant entre 450 g. au moins et 550 g. au plus.

Le sexe est indifférent à condition d'éliminer les femelles gravides hypersensibles à l'anesthésique et au toxique.

2°) *Préparation des animaux et mode d'anesthésie.* — L'anesthésique employé est l'uréthane en solution à 25 p. 100 injecté par voie intra-péritonéale à la dose de 1 g. par kg. L'animal a été privé de nourriture au moins quatre heures avant l'injection et présente une anesthésie complète 30 minutes environ après l'injection.

L'anesthésie dure pendant toute l'expérience et la respiration artificielle est inutile.

3°) *Précautions à observer au cours de la perfusion.* — Le liquide est perfusé dans la veine jugulaire en un temps qui doit être voisin de 20 minutes. La dilution est calculée de façon à obtenir une durée d'expérience sensiblement égale, et le volume de liquide perfusé est relativement constant.

La perfusion est établie selon un rythme permettant d'obtenir la mort dans le temps donné soit 0cc,60 par minute et kg.

Afin d'éviter d'injecter un excès de produit, on diminue légèrement ce rythme vers la fin de l'expérience, lorsque les battements de la carotide cessent d'être apparents.

4°) *Test de la mort cardiaque.* — La mort de l'animal est constatée par l'observation de l'arrêt des battements cardiaques suivis à l'aide d'une aiguille enfoncée dans le muscle cardiaque. Cet arrêt est confirmé par l'examen du cœur *in situ* après ouverture de la paroi.

5°) *Calculs de la dose minimum mortelle.* — Pour calculer la dose minimum mortelle nous avons suivi les règles de BURN adoptées par K. COWARD : ces auteurs tiennent compte de tous les résultats obtenus et n'écartent pas des moyennes les chiffres aberrants.

La dose mortelle minimum X est la moyenne des chiffres obtenus dans la totalité des essais ; elle s'exprime par la formule suivante :

$$X = \left(\frac{x'}{y'} + \frac{x''}{y''} + \frac{x}{y''} \right) \frac{1}{n}$$

dans laquelle les x expriment les volumes de soluté injecté aux divers animaux d'expérience, les y les poids respectifs des cobayes utilisés, et n le nombre des essais effectués

2) Résultats expérimentaux

Nous avons groupé dans une série de tableaux les expériences effectuées. Dans chacun des tableaux figurent :

- 1°) le sexe des animaux utilisés,
- 2°) leur poids en grammes
- 3°) le nombre de cc perfusés par minute et par kg.
- 4°) le nombre de cc nécessaires pour obtenir l'arrêt du cœur
- 5°) » » » par kg » »
- 6°) le temps nécessaire à l'arrêt du cœur
- 7°) le nombre de cc par kg de cobaye de soluté non dilué ayant amené l'arrêt du cœur.

Pour l'essai physiologique, les solutés perfusés ont été dilués au quart dans du sérum physiologique à 8 p. 1000; cette dilution étant calculée afin que la durée de l'expérience soit voisine de 20 minutes. Nous avons dosé sur le cobaye deux solutés de titre différent ; le soluté A avec lequel nous avons fait deux séries de dosage, et le soluté B qui n'a été l'objet que d'une série de dosage, le plus actif ayant été choisi comme étalon.

Telle qu'elle apparaît dans le tableau III, la dose minimum mortelle moyenne du soluté A déterminée par perfusion lente chez le cobaye est de 3 cc 37 pour la première série de dosage et de 2 cc 67 dans un deuxième dosage effectué un an après le premier. (tableau IV)

La dose minimum mortelle de la solution B est de 1 cc. 59. (tableau V)

TABLEAU III

Perfusion lente chez le cobaye du soluté A.

Sexe et poids (en gr.)	Nombre de cc. perfusés (min. et kg.)	Nombre de cc. perfusés sol. A dilué 1/4	Nombre de cc. par kg. sol. A au 1/4	Temps néces. à l'arrêt du cœur min.	Nombre de cc. par Kg. sol. A non dilué
♂ 580 gr.	0 cc. 60	7 cc. 75	13 cc. 36	15 min.	3 cc. 34
♂ 575 gr.	0 cc. 60	8 cc. 20	14 cc. 26	16 min.	3 cc. 56
♂ 570 gr.	0 cc. 60	9 cc. 00	15 cc. 78	17 min.	3 cc. 94
♂ 560 gr.	0 cc. 60	6 cc. 00	10 cc. 71	12 min.	2 cc. 67
♂ 560 gr.	0 cc. 60	9 cc. 25	13 cc. 40	15 min.	3 cc. 35
				moyenne:	3 cc. 37

TABEAU IV
Perfusion lente chez le cobaye du soluté A.

Sexe et poids en gr.	Nombre de cc. perf. min et Kg.	Nombre de cc perf. soluté A au 1/4	Nombre de cc. perf. par kg. sol. A au 1/4	Temps néces. à l'arrêt du cœur (min.).	Nombre de cc. par Kg. sol. A non dil.
♂ 450 gr.	0 cc. 60	7 cc. 90	17 cc. 55	26 min.	4 cc. 38
♀ 495 gr.	0 cc. 60	4 cc. 00	8 cc. 08	14 min.	2 cc. 02
♂ 490 gr.	0 cc. 60	5 cc. 10	10 cc. 40	15 min. 45	2 cc. 60
♂ 485 gr.	0 cc. 60	5 cc. 14	10 cc. 50	16 min.	2 cc. 62
♂ 470 gr.	0 cc. 60	5 cc. 25	11 cc. 17	19 min.	2 cc. 79
♂ 455 gr.	0 cc. 60	3 cc. 82	8 cc. 39	14 min 45	2 cc. 09
♂ 470 gr.	0 cc. 60	3 cc. 06	6 cc. 51	10 min	1 cc. 62
♂ 480 gr.	0 cc. 60	3 cc. 83	7 cc. 97	12 min. 40	1 cc. 99
♂ 500 gr.	0 cc. 60	4 cc. 60	9 cc. 20	14 min. 45	2 cc. 30
♂ 450 gr.	0 cc. 60	7 cc. 85	17 cc. 44	26 min.	4 cc. 36
				moyenne	2 cc. 67

TABEAU V
Perfusion lente chez le cobaye du soluté B.

Sexe et poids (g)	Nombre de cc perfusés (min. et kg.)	Nombre de cc. perfusés sol. B. au 1/4	Nombre de cc. par kg de sol. B. au 1/4	Temps néces. arrêt du cœur (minutes)	Nombre de cc. par kg de sol B. non dilué
♂ 400 gr.	0 cc. 60	3 cc. 60	9 cc.	14 min. 45	2 cc. 25
♂ 410 gr.	0 cc. 60	1 cc. 80	4 cc. 39	7 min. 45	1 cc. 09
♂ 480 gr.	0 cc. 60	4 cc. 15	8 cc. 64	13 min. 30	2 cc. 16
♀ 415 gr.	0 cc. 60	2 cc. 20	5 cc. 30	7 min.	1 cc. 32
♂ 440 gr.	0 cc. 60	3 cc. 15	7 cc. 15	11 min.	1 cc. 78
♂ 490 gr.	0 cc. 60	2 cc. 60	5 cc. 30	9 min.	1 cc. 32
♂ 500 gr.	0 cc. 60	1 cc. 95	3 cc. 90	7 min.	0 cc. 97
♂ 450 gr.	0 cc. 60	2 cc. 95	6 cc. 55	11 min.	1 cc. 63
♂ 475 gr.	0 cc. 60	2 cc. 50	5 cc. 26	9 min.	1 cc. 31
♂ 480 gr.	0 cc. 60	3 cc. 90	8 cc. 33	12 min.	2 cc. 08
				moyenne :	1 cc. 59

Les doses minima mortelles, moyennes des solutés A et B déterminées par perfusion lente, en un temps voisin de 20 minutes, chez un cobaye anesthésié à l'uréthane sont donc respectivement de 3 cc. 37 ; 2 cc. 67 ; 1 cc. 59 exprimés en cc de soluté non dilué.

II. — Lapin

La méthode de perfusion lente a été appliquée pour la première fois au lapin par DEJEAN (1907), mais n'a pas été adoptée couramment dans le dosage des digitaliques, en raison de l'hyposensibilité que présente cet animal vis à vis de la digitale.

Cependant les expériences de CAHEN et LAUNAY sur la scille ayant montré, dans ce cas particulier, l'intérêt d'utiliser cet animal, nous l'avons à notre tour expérimenté.

Ce choix s'est trouvé justifié, étant donnée la toxicité du venin vis à vis du lapin. De plus, contrairement à l'opinion de certains auteurs (PIEROTTI, ABEL et MACHT) nos expériences établissent que le lapin est plus sensible que le cobaye à l'action de ce produit.

Dans les chapitres qui vont suivre, nous rappellerons brièvement les conditions expérimentales nécessaires au dosage ; puis, nous donnerons les résultats de ces expériences.

1) Conditions expérimentales.

La technique de perfusion lente chez le lapin est identique à celle que l'on emploie chez le cobaye, à savoir : l'injection dans la veine jugulaire de l'animal anesthésié, non soumis à la respiration artificielle.

Nous nous bornerons à signaler les précautions nécessaires pour obtenir un dosage rigoureux.

1^o) *Choix des animaux et nombre.* — Les lapins utilisés sont d'un poids de 2 kg environ et comportent surtout des mâles ; on élimine les femelles gravides.

NYIRI et DUBOIS adoptant la suggestion de TREVAN poursuivent les dosages jusqu'à ce que les chiffres aberrants perdent leur influence sur la moyenne générale. Ils indiquent, cependant, qu'en général 4 à 5 animaux par essai suffisent. Pour nos essais, nous avons adopté un minimum de 6 animaux (chiffre choisi par RAPSON, UNDERHILL, CAHEN et LAUNAY).

2^o) *Mode d'anesthésie.* — Comme anesthésique nous avons utilisé celui qui nous avait donné de bons résultats lors des perfusions chez le cobaye : l'éuréthane, administré par voie intrapéritonéale.

3^o) *Précautions à observer au cours de la perfusion.* — a) température et concentration du liquide de perfusion. Le liquide de perfusion, administré à la température du laboratoire, est comme pour le cobaye, un extrait aqueux dilué au quart.

b) vitesse de la perfusion. La vitesse de perfusion est maintenue uniforme, pendant la première partie de l'expérience, soit 0 cc. 20 par minute et kg. d'animal. Cependant comme pour le cobaye, nous avons légèrement diminué la vitesse après avoir observé l'affaïssement de la carotide.

4°) *Test de la mort cardiaque.* — Nous avons pris comme test de l'intoxication cardiaque, l'arrêt du myocarde. Ce test nous a paru aussi précis que pour le cobaye.

5°) *Durée de l'expérience.* — Nous avons cherché à provoquer la mort de l'animal en un temps voisin de 40 minutes.

2) Résultats expérimentaux.

Par la méthode décrite ci-dessus, nous avons procédé à l'essai biologique de deux solutés aqueux de titre différent, le soluté A et le soluté B. Comme précédemment, il s'agit d'un soluté aqueux dilué au quart, dans du sérum physiologique à 8 p 1000 pour que le temps de perfusion soit voisin de 40 minutes. Nous suivrons dans l'exposé de nos expériences le même plan que dans le chapitre précédent.

La toxicité de chaque préparation a été déterminée sur 6 lapins et la dose minimum mortelle moyenne est exprimée en cc de soluté non dilué.

TABLEAU VI

Perfusion lente chez le lapin du soluté A.

Sexe et poids (g)	Nombre de cc. perfusés (min. et kg)	Nombre de cc. perfusés sol. A au 1/4	Nombre de cc. perfusés par kg sol. A au 1/4	Temps nécessaire arrêt du cœur (min.)	Nbre de cc par kg soluté B non dilué.
♂ 4.310 gr.	0 cc. 20	35 cc. 20	10 cc. 05	40 min. 15	2 cc. 51
♂ 2.150 gr.	0 cc. 20	24 cc. 65	11 cc. 46	60 min.	2 cc. 86
♂ 2.520 gr.	0 cc. 20	26 cc. 50	10 cc. 51	53 min. 30	2 cc. 62
♂ 2.140 gr.	0 cc. 20	18 cc. 85	8 cc. 90	46 min.	2 cc. 24
♂ 1.950 gr.	0 cc. 20	14 cc. 25	7 cc. 12	73 min.	1 cc. 78
♂ 2.490 gr.	0 cc. 20	21 cc. 10	8 cc. 35	46 min. 30	2 cc. 08
				moyenne :	2 cc. 34

Telle qu'elle résulte du tableau précédent N° VI la dose minimum mortelle moyenne du soluté A est de 2 cc. 34 exprimé en soluté non dilué. Celle du soluté B dont le dosage figure au tableau VII est de 1 cc 19.

TABLEAU VII

Perfusion lente chez le lapin du soluté B.

Sexe et poids (gr.)	Nbre de cc. perfusés (min. et kg)	Nombre de cc perfusés sol. B au 1/4	Nombre de cc. perfusés par kg sol. B. au 1/4	Temps néces. arrêt du cœur (min.)	Nombre de cc. par kg. sol. B. non dilué
♂ 2.250 gr.	0 cc. 20	8 cc. 50	3 cc. 77	18 min	0 cc. 94
♂ 2.220 gr.	0 cc. 20	12 cc. 95	5 cc. 88	30 min.	1 cc. 47
♂ 2.550 gr.	0 cc. 20	11 cc. 75	4 cc. 60	24 min.	1 cc. 15
♂ 2.320 gr.	0 cc. 20	10 cc. 80	4 cc. 65	23 min.	1 cc. 16
♂ 2.400 gr.	0 cc. 20	11 cc. 50	4 cc. 79	24 min. 10	1 cc. 19
♂ 2.510 gr.	0 cc. 20	12 cc. 85	5 cc. 11	26 min 15	1 cc. 27
moyenne :					1 cc. 19

Ainsi les doses minima moyennes mortelles des solutés A et B dosés par la méthode de perfusion lente sur le lapin sont respectivement de 2 cc 34 et 1 cc. 19 exprimés en soluté non dilué.

CHAPITRE III

MÉTHODES STATISTIQUES DE DOSAGE

Les méthodes de dosage examinées dans le précédent chapitre consistaient à déterminer la dose minimum mortelle moyenne obtenue par perfusion lente d'un certain nombre d'animaux. Il nous a paru intéressant de compléter ces données avec les résultats fournis par les méthodes dites statistiques. Rappelons que ces méthodes sont basées sur le fait que le pourcentage des mortalités observé sur des lots d'animaux recevant des doses inférieures à la dose minimum mortelle varie précisément en fonction de la dose injectée.

Ces méthodes introduites dans la science par TREVAN sont basées sur les variations de sensibilité des animaux. En effet, TREVAN a montré que pour des doses subtoxiques, la mortalité d'animaux de même souche est fonction des doses administrées. Ainsi la sensibilité individuelle dans une même espèce, considérée par de nombreux auteurs comme un obstacle à la précision des dosages biologiques peut constituer le principe même d'une méthode de dosage.

Pour utiliser cette méthode, il est nécessaire d'avoir à sa disposition une substance type, prise comme étalon, auquel on comparera les diverses substances dont on doit déterminer la valeur.

L'étalon est administré à doses variables à divers lots d'animaux ; on note le pourcentage des mortalités qui se produisent après un même laps de temps arbitrairement choisi chez des animaux ayant reçu une même dose. Les résultats obtenus permettent de construire une *courbe dite de mortalité* ; on porte en abscisses les doses croissantes administrées et en ordonnées le pourcentage des mortalités correspondantes.

Cette courbe étant construite, il est possible de déterminer en fonction de l'étalon l'activité d'une substance de même nature. Pour faire cette détermination, il suffit d'injecter à un certain nombre d'animaux, une dose déterminée de la substance à examiner et de noter le pourcentage des

mortalités qui s'ensuivent et qui doit être voisin de 50 %. En utilisant la courbe de mortalité, on peut déduire la toxicité de la substance examinée par rapport à la toxicité de l'étalon.

Ces méthodes ont été expérimentées chez la souris et la grenouille. Nous avons exposé les résultats de nos expériences selon le mode de présentation des résultats de SABULO-NYASAKI ; de plus, nous avons eu recours à la méthode de BEHRENS et de DRAGSTEDT et LANG pour calculer la dose mortelle moyenne (1). Ces auteurs ont, en effet, exposé un mode de calcul permettant d'obtenir une dose mortelle très voisine de celle obtenue par la courbe de TREVAN. Ces divers modes d'expression des calculs de toxicité sont aujourd'hui classiques et présentent tous leur intérêt. Aussi faisons-nous figurer dans un tableau le résumé des résultats obtenus, afin de les comparer.

1) Méthode statistique de toxicité chez la souris

La souris est l'animal le plus fréquemment utilisé en pharmacologie pour les déterminations de toxicité et cependant on l'emploie rarement pour effectuer le dosage biologique des cardiotoniques. Ce fait tient à deux points principaux : d'une part, ces animaux seraient hyposensibles à certains cardiotoniques et présenteraient une grande différence de sensibilité individuelle et, d'autre part, selon certains auteurs, tels que CUSHNY, KNAFF-LENZ, et STERN, il serait difficile de déterminer si la mort survient par arrêt cardiaque ou respiratoire. Cependant, étant donnée la facilité de l'expérimentation chez la souris et les résultats intéressants obtenus dans la standardisation des digitaliques par KROGH et ROWE, nous avons cru intéressant de chercher à mettre au point cette méthode pour le venin de crapaud.

Etant donné que nous avons observé une concomitance entre l'arrêt respiratoire et l'arrêt cardiaque, que les pourcentages de mortalité sont obtenus avec des doses bien échelonnées et assez voisines, il nous a semblé que la souris peut se prêter au dosage biologique du venin de crapaud. Deux voies d'introduction ont été utilisées chez la souris : la voie intrapéritonéale et la voie intraveineuse. Dans les lignes qui vont suivre, après avoir rappelé brièvement les principales précautions suivies dans la mise au point de cette technique, nous signalerons le comportement particulier des animaux au cours de l'intoxication par le venin.

(1) voir plus loin page 19.

1. — DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ EFFECTUÉE PAR VOIE INTRAPÉRITONÉALE

Comme dans les chapitres précédents, nous rappellerons brièvement les diverses précautions prises et les modalités de l'expérimentation dans l'essai du venin de crapaud administré par voie intrapéritonéale.

1^{re}) Conditions expérimentales.

a) *Race*. — Les souris utilisées sont de même souche, provenant d'un même élevage et ont été soumises au même régime alimentaire et maintenues dans les mêmes conditions.

b) *Poids*. — Chaque série de 12 animaux comporte des souris d'un poids moyen de 16 g. Les séries sont aussi homogènes que possible, car on a soin de répartir également les poids dans chaque série.

c) *Sexe*. — Aucun auteur ne signale de différence concernant la résistance des deux sexes. Parmi nos animaux, il y avait nettement prédominance du sexe mâle. Les animaux gravides sont toujours écartés.

d) *Préparation des animaux*. — TRENDLENBURG (1910) a déterminé le rôle de l'alimentation dans la résistance des animaux et les travaux récents sur les vitamines n'ont pu que confirmer l'importance capitale qu'elle peut jouer. Aussi nous sommes-nous efforcés de maintenir les animaux dans des conditions alimentaires les meilleures. Les souris, placées dans de larges cristallisoirs à température constante ont séjourné une dizaine de jours au laboratoire avant d'être utilisées. Pendant ce temps, elles ont reçu une nourriture abondante et variée qui n'a pas été suspendue avant l'expérience.

e) *Modalité de l'injection*. — La dose à injecter est calculée d'après le poids de l'animal. Cette dose est mesurée à l'aide d'une pipette graduée au centième de cm³ (modèle de LEVADITI).

Le liquide ainsi mesuré est injecté à l'aide d'une seringue de 1 cm³ à laquelle est adaptée une aiguille à biseau court de 20 mm, 5-10 mm. L'injection se fait par voie intrapéritonéale. La souris étant maintenue en extension, on fait pénétrer l'aiguille à la racine de la cuisse et l'on pousse lentement le liquide injectable. Les solutions employées ont toujours une activité telle que la dose à injecter présente un volume maximum de 0cc.80, volume qu'il y aurait inconvénient à dépasser chez la souris.

Après l'injection, on laisse la souris en observation, en la protégeant non seulement du froid, mais en lui assurant une température constante d'environ 25°.

Généralement, la mort survient en un temps voisin d'une heure. Pour plus de sûreté dans la statistique, et malgré cette constatation expérimentale, nous avons déterminé le pourcentage de mortalité survenu en 24 h. En effet, il nous semble peu physiologique de déterminer la toxicité en un temps trop rapide pour que la pénétration du produit ait pu s'opérer.

TABLEAU VIII

Pourcentage de mortalité obtenue chez la souris par voie intrapéritonéale
(exprimé d'après la méthode de SABULO-NYASAKI)

Doses en cc. calculées pour 16 gr. d'animaux	o cc. 60	Temps de mort en min.	o cc. 55	Temps de mort en min.	o cc. 50	Temps de mort en min.	o cc. 45	Temps de mort en min.	o cc. 40	Temps de mort en min.	o cc. 35	Temps de mort en min.	o cc. 25	Temps de mort en min.
Morts (+) et survies (o) des animaux d'expérience	+	7 min.	+	5 min.	+	12 min.	+	5 min.	+	30 min.	+	20 min.	o	
	+	11 min.	+	15 min.	+	4 min.	+	10 min.	+	8 min.	+	65 min.	o	
	+	12 min.	+	9 min.	+	8 min.	+	11 min.	o	13 min.	+	40 min.	o	
	+	8 min.	+	10 min.	+	7 min.	o	9 min.	o		o		o	
	+	7 min.	+	6 min.	+	19 min.	o	7 min.	o		o		o	
	+	15 min.	+	6 min.	+	6 min.	o	16 min.	o		o		o	
	+	55 min.	+	7 min.	+	1 min.	o				o		o	
	+	11 min.	+	13 min.	o		o				o		o	
	+	9 min.	+	11 min.	o		o				o		o	
	+	5 min.	+	11 min.	o		o				o		o	
	+	4 min.	o	11 min.	o		o				o		o	
	+	10 min.	o		o		o				o		o	
Nombre d'animaux.	12		12		12		12		6		12		12	
% de morts observés 24 h. après l'injection	100		83,33		58,33		50		33,33		25		0	

2) Comportement des souris au cours de l'intoxication.

a) *Fortes doses.* — Aussitôt après l'injection d'une dose toxique soit 0 cc, 50 à 0 cc, 60 du soluté A par exemple, l'animal présente une certaine agitation ; puis après quelques minutes, apparaît une dyspnée très marquée, la souris restant immobile, pelotonnée sur elle-même. On note ensuite l'apparition de convulsions cloniques, bientôt suivies de violentes convulsions épileptiformes. Entre ces accès, l'animal couché sur le flanc, parvient à se relever péniblement, mais ne peut marcher qu'en trainant ses membres postérieurs. Lorsqu'une période d'accalmie succède à cette phase aigue, on peut faire réapparaître ces convulsions par des excitations extérieures (bruits, choc). Ces accès se reproduisent spontanément par intervalles de 2 à 5 minutes.

Si la mort doit survenir, la dyspnée persiste jusqu'au bout : les yeux prennent une teinte de plus en plus foncée et présentent un certain degré d'exophtalmie.

b) *Doses moyennes.* — Lorsque la dose est subtoxique, soit 0 cc 40 du soluté A par exemple, les accès convulsifs s'espacent et l'animal entre dans un état de torpeur durant lequel on peut obtenir par des excitations énergiques, un accès convulsif.

c) *Doses faibles.* — Les souris peuvent présenter également à doses plus faibles, par ex. avec 0 cc 35 du soluté A, de la dyspnée, des convulsions, une parésie des membres inférieurs, mais le plus souvent, on ne constate, après une certaine phase d'excitation, qu'un état de torpeur qui se dissipe bientôt avec retour à l'intégrité.

En règle générale, on peut dire que si l'animal ne meurt pas dans les 60 ou 90 minutes qui suivent l'injection, la survie est presque certaine quelle que soit la dose injectée.

3) Résultats expérimentaux.

Nos déterminations de la toxicité chez la souris par voie intrapéritonéale, ont été réalisées avec le soluté A déjà utilisé dans nos dosages par perfusion lente. Pour calculer la dose létale moyenne, nous avons utilisé les diverses conceptions aujourd'hui classiques de SABULO-NYASAKI, TREVAN, BEHRENS, DRAGSTEDT et LANG.

a) *Expression des résultats suivant SABULO-NYASAKI*, modifié par nous, dans le tableau suivant VIII inspiré du mode de présentation de SABULO-NYASAKI, nous avons fait figurer les résultats de nos essais avec le soluté A, en représentant par le signe + les animaux ayant succombé et par le signe o les animaux ayant survécu.

On voit ainsi nettement le nombre d'animaux employé pour chaque dose et le pourcentage de morts obtenu avec chacune de ces doses. Le temps nécessaire pour obtenir la mort est exprimé en minutes.

b) *Expression des résultats selon TREVAN.* — A l'aide de ces résultats, il est possible de construire, comme l'avait imaginé TREVAN, une courbe de mortalité : on porte en abscisses les doses croissantes administrées et en ordonnées le pourcentage des mortalités correspondantes.

Cette courbe est semblable à celle qu'obtenait BURN (1) avec la digitale : elle a la forme caractéristique des courbes en S de SHACKEL et de TREVAN. La courbe fait avec l'axe des ordonnées un angle d'autant moins grand que l'activité du produit est plus grande.

Estimation de l'activité d'un soluté d'après la courbe de pourcentage.

A l'aide de cette courbe, il est possible d'évaluer l'activité d'un soluté de venin de crapaud par rapport à un étalon : on compare le pourcentage de mortalité (M) donné par les deux solutions (M : — étalon et Mx de taux inconnu figurant à l'ordonnée de la courbe, et en lisant sur l'abscisse les toxicités (T) correspondantes soit Tx et Te. Il suffit d'utiliser la formule générale suivante qui s'applique quelle que soit la concentration du soluté étalon (Ce) causant la mortalité Me et du soluté à titrer (Cx), donnant la mortalité Mx.

$$\frac{T_x}{T_e} = \frac{C_e}{C_x}$$

c) *Autres modes d'expression de la toxicité moyenne.* — Dans les cas où l'on ne dispose pas d'une courbe caractéristique, il existe d'autres moyens d'estimer la dose léthale 50. Ces divers modes d'expression ont fait l'objet d'un exposé accompagné d'intéressantes critiques de la part de REGNIER, LAMBIN et SZOLLOSI. Nous en donnons un bref résumé.

Ces auteurs mentionnent tout d'abord la recherche de la dose mortelle médiane correspondant au pourcentage de 50 % de mort des animaux en expérience, d'après la moyenne arithmétique de SOLLMAN. On prend comme dose mortelle 50 la moyenne arithmétique entre la plus faible dose mortelle toujours efficace, tuant tous les animaux d'une série et la plus forte dose inefficace c'est-à-dire celle qui ne parvient pas à tuer un seul animal de la série.

La moyenne arithmétique de TREVAN tient compte de l'accroissement du pourcentage de mortalité correspondant à chaque intervalle de dose, ce qui aboutit au calcul suivant :

$$DM = \frac{\sum (f \times d)}{\sum f}$$

DM étant la dose mortelle moyenne

f = l'accroissement des pourcentages de mortalité entre deux doses successives

d = la moyenne arithmétique entre deux doses successives

$\sum f = 100$

(1) BURN, loc. cit. p. 8.

KARBER présenta une variante de cette formule adoptée par BEHRENS.

$$DM = Df - \sum \frac{(a \times b)}{m}$$

Dans cette formule la dose mortelle DM cherchée correspond au produit de la 1/2 somme des morts pour 100 (b) à 2 doses successives multiplié par la différence entre 2 doses successives (a). Ce résultat doit finalement être retranché de la dose Df qui tue tous les animaux du groupe. m, étant égale à 100.

Cette formule de KARBER adoptée par BEHRENS permet toujours d'obtenir une valeur positive pour le nombre d'animaux morts à un intervalle de dose quelconque. En effet, ce nombre de morts est obtenu ici, non par différence, mais en faisant la demi-somme des animaux morts à 2 doses successives. Il est donc toujours positif même si la dose la plus forte a entraîné moins de mortalité que la plus faible dose.

REGNIER et SZOLLOSI exposent enfin les travaux de DRAGSTEDT et LANG qui partent des mêmes considérations que BEHRENS.

Ces auteurs admettent qu'on peut considérer tout animal ayant survécu à une dose donnée, comme ayant survécu à toutes les doses inférieures à celles-ci et tout animal ayant succombé à une dose donnée est supposé avoir succombé à toutes les doses plus fortes. Ils expriment leurs résultats de la façon suivante ; la première colonne représente les doses administrées, la seconde colonne les résultats observés, comportant dans la partie gauche les survies, et dans la partie droite, les morts réellement observées dans le groupe expérimenté. Dans la troisième colonne, nous donnons les chiffres calculés selon les principes de DRAGSTEDT et LANG. Ces chiffres sont obtenus en portant dans la partie gauche les sommes des survies figurant dans la 2^{me} colonne en partant de la plus forte dose et dans la partie droite les sommes des morts en partant de la plus faible dose.

Ce raisonnement permet donc de totaliser pour chaque dose le nombre de morts et de survies observées. Il suffit, pour avoir la dose léthale 50, de lire la dose pour laquelle les valeurs des chiffres totaux de morts et de survie sont les plus rapprochés. Cette façon de présenter les résultats semble donner, pour les animaux employés, une image plus exacte de la toxicité du produit et de trouver assez exactement la dose léthale moyenne.

Nous allons donner maintenant, sous forme de tableaux, l'ensemble des résultats obtenus dans la détermination de la dose léthale moyenne (BEHRENS et KARBER) et de la dose léthale médiane (méthode de DRAGSTEDT et LANG) par l'une et l'autre des voies d'introduction.

TABLEAU IX

Dose létale 50 (DM) calculée chez la souris, (voie intrapéritonéale)
d'après la méthode de BEHRENS

Doses en cc. calculées pour 16 gr.	0 cc. 25	0 cc. 35	0 cc. 40	0 cc. 45	0 cc. 48	0 cc. 50	0 cc. 55	0 cc. 60
Survies	100	75	67	75	40	42	17	0
Morts	0	25	33	25	50	58	83	100
b	12.5	29	29	37.05	54	70.5	91.5	
a	0.1	0.05	0.05	0.03	0.02	0.05	0.05	
b x a	1.25	1.45	1.45	0.825	1.08	3.525	4.575	

$$DM = 0 \text{ cc. } 60 - \frac{14 \cdot \text{cc. } 155}{100} = 0 \text{ cc. } 45845 \text{ pour une souris de 16 gr.}$$

$$Df = 0 \text{ cc. } 60$$

b = la moyenne de la somme des morts pour 100 à 2 doses successives

a = différence entre 2 doses successives

$$m = 100$$

TABLEAU X

Dose létale 50 calculée chez la souris (voie intrapéritoneale) d'après la
méthode de DRAGSTEDT ET LANG).

Doses en cc. pour 16 gr. d'animal	Observées		Calculées	
	Survie	Mort	Survie	Mort
0 cc. 25	12	0	47	0
0 cc. 35	9	3	31	3
0 cc. 40	4	2	26	5
0 cc. 45	9	3	22	8
0 cc. 48	6	6	13	14
0 cc. 50	5	7	7	21
0 cc. 55	2	10	2	31
0 cc. 60	0	12	0	43

La dose létale 50 est la dose pour laquelle les volumes des chiffres
totaux de morts et de survie sont les plus rapprochés, soit ici 0 cc. 48
pour une souris de 16 gr.

L'examen des tableaux précédents nous permet donc d'obtenir chez la souris injectée par voie intrapéritonéale avec le soluté A la dose léthale 50 de :

0 cc, 48 selon le calcul de TREVAN

0 cc, 45 » » de BEHRENS

0 cc, 48 » » de DRAGSTEDT et LANG

ces doses sont rapportées à l'animal d'un poids moyen de 16 g. ce qui équivaut à 30 cc par kilo d'animal selon le calcul de TREVAN et de DRAGSTEDT et LANG et 28 cc selon BEHRENS.

II. — DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ EFFECTUÉE PAR VOIE INTRAVEINEUSE

Il nous a semblé intéressant de comparer les résultats précédents obtenus chez la souris par voie intrapéritonéale, avec ceux obtenus par la voie intraveineuse. Le venin de crapaud étant un produit vasoconstricteur, il était en effet curieux de voir si sa résorption par voie intraveineuse était capable de donner des résultats plus constants que par voie intrapéritonéale.

1) Conditions expérimentales.

Nous indiquerons brièvement les particularités de la technique suivie.

a) *Poids et nombre des animaux.* — Les animaux employés, provenant tous du même élevage, sont choisis d'un poids allant de 14 g. à 20 g. L'essai est fait sur des séries de 12 souris dont les poids sont également répartis dans chaque série.

b) *Modalité de l'injection.* — On rend les veines de la queue apparentes, en la trempant dans de l'eau chaude ; en quelques minutes les veines sont distendues par le sang.

Le soluté est injecté lentement dans la queue au moyen d'une aiguille spéciale très fine et courte adaptée à une seringue divisée en centièmes de cm³.

Les doses utiles à la construction de la courbe s'étendent de 0 cc, 20 à 0 cc, 25 et ont été très facilement mesurées à l'aide de cette seringue de Ricord.

Le liquide est injecté lentement et progresse sans difficulté si l'on se trouve dans la veine.

2) Comportement des souris au cours de l'intoxication.

L'intoxication prend une allure différente de celle qu'on observe par la voie intrapéritonéale. La mort peut survenir immédiatement après l'injection et même au cours de l'injection. Avec des doses variant de 0 cc 20 à 0 cc 25 deux cas peuvent se présenter: ou bien l'animal succombe en quelques minutes, rarement après une heure et on note l'apparition de quelques convulsions, de la dyspnée; ou bien l'animal survit, présentant des convulsions plus rares encore. Après une phase de dyspnée, la respiration redevient rapidement normale, l'animal montre un degré accentué de torpeur pouvant s'observer encore le lendemain.

En conclusion, si la mort ne survient pas dans les 5 à 7 minutes qui suivent l'injection, le retour à l'intégrité est presque certain.

3) Résultats expérimentaux.

Nous consignons dans les tableaux XI, XII, XIII, les résultats de nos déterminations de toxicité.

a) Expression des résultats suivant SABULO-NYASAKI.

Dans le tableau XI (v. p. précé lente) figure le nombre d'animaux employés pour chaque dose, et le pourcentage de morts obtenues avec chacune de ces doses.

b) Expression des résultats suivant la méthode représentative de TREVAN.

A l'aide de ces résultats, il est possible comme ci-dessus de construire une courbe de mortalité; on porte en abscisses les doses administrées et en ordonnées le pourcentage des mortalités correspondantes.

Cette courbe, elle aussi, a l'allure des courbes en S de SCHACKEL et de TREVAN. Cette courbe fait avec l'axe des ordonnées un angle plus ou moins important selon que l'activité du produit est plus ou moins grande.

Estimation de l'activité d'un soluté d'après la courbe de pourcentage. — La formule d'estimation de la toxicité déterminée par voie intrapéritonéale que nous avons détaillée page 18 s'applique bien entendu, dans le cas de la toxicité recherchée par voie intraveineuse.

COURBE DITE DE TOXICITÉ CHEZ LA SOURIS (VOIE INTRAVEINEUSE).

En abscisses sont portées les doses croissantes de soluté de venin de crapaud.

En ordonnées le pourcentage de mortalité obtenu en 24 h.

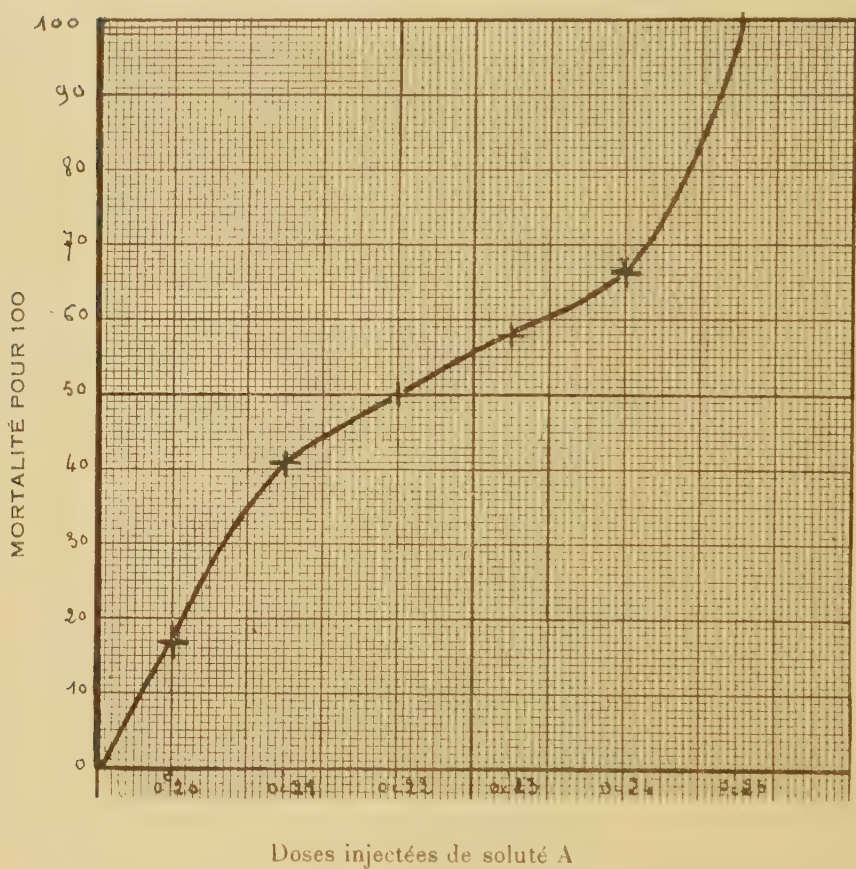


TABLEAU XII

c) Expression des résultats suivant BEHRENS, DRAGSTEDT et LANG.

Dose létale 50 (DM) calculée chez la souris (voie intraveineuse), d'après la méthode de BEHRENS.

Doses en cc calculées p. 16 g. d'animal	0 cc. 20	0 cc. 21	0 cc. 22	0 cc. 23	0 cc. 24	0 cc. 25
Survies	82,5	59	50	42	34	0
Morts	17,5	41	50	58	66	100
b	29,25	45,50	54	62	83	
a	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
b x a	0,292	0,45	0,540	0,620	0,830	

$$DM = 0,25 - \frac{2,737}{100} = 0,222 \text{ pour une souris de 16 gr.}$$

$$Df = 0 \text{ cc. } 25$$

b = moyenne de la somme des morts pour cent à 2 doses successives.

a = différence entre 2 doses successives

$$m = 100$$

TABLEAU XIII

Dose létale 50 calculée chez la souris, (voie intraveineuse), d'après la méthode de DRAGSTEDT et LANG).

Dose en cc. calculées pour 16 gr. d'animal	Observées		Calculées	
	Survie	Mort	Survie	Mort
0 cc. 20	10	2	33	2
0 cc. 21	7	5	23	7
0 cc. 22	6	6	16	13
0 cc. 23	6	7	10	20
0 cc. 24	4	8	4	28
0 cc. 25	0	12	0	40

La dose létale 50 est la dose pour laquelle les valeurs des chiffres totaux de mort et de survie sont les plus rapprochées : soit ici 0 cc. 22, pour une souris de 16 gr.

L'examen des tableaux précédents nous permet d'obtenir, chez la souris injectée par voie intraveineuse, la dose léthale 50 de :

0 cc, 22 selon le calcul de TREVAN

0 cc, 22 — — de BEHRENS

0 cc, 22 — — de DRAGSTEDT et LANG.

Ces doses sont calculées pour une souris d'un poids moyen de 16 gr. ce qui équivalait à 13 cc 75 par kg. d'animal.

II Méthode statistique de toxicité chez la grenouille

Tandis que la souris est peu utilisée pour le titrage des produits digitaliques, la grenouille est couramment employée dans les laboratoires pour mesurer l'activité de ces produits. La grenouille, est comme on le sait, utilisée depuis longtemps par les pharmacologues (FÖCKE, JOANIN) : mais son emploi avait tout d'abord donné de mauvais résultats, soit parce que le nombre expérimenté était trop restreint, soit parce qu'on s'était borné à déterminer, non pas la dose minimum mortelle, mais le temps nécessaire pour amener la mort. L'application à la grenouille des méthodes statistiques de TREVAN conduisit à des résultats très précis et très constants.

Actuellement l'utilisation de cet animal figure dans les pharmacopées étrangères (Etats-Unis, Grande Bretagne, 1928) et dans le Codex Français de 1937). Dans un premier paragraphe, nous rappelons simplement les quelques précautions prises pour expérimenter sur le venin de crapaud cette méthode devenue classique, en précisant que nous avons opéré sur deux espèces de grenouilles, *Rana esculenta* L. et *Rana temporaria* L., les plus fréquemment utilisées au laboratoire.

Dans un deuxième paragraphe, nous rapportons les résultats obtenus et présentés suivant les divers modes d'expression de la toxicité : ils est possible de construire à l'aide de ceux-ci des courbes de toxicité d'allure différente pour les deux espèces qui ont révélé chacune une sensibilité particulière.

1) Conditions expérimentales.

Les conditions expérimentales que nous avons pu préciser au cours de nos recherches concernent principalement l'origine et la nature des grenouilles utilisées ainsi que la technique de l'injection.

a) *Origine géographique.* — Pour la première des deux espèces employée (*Rana esculenta* L.), nous avons expérimenté sur différents lots provenant du Nord de l'Italie et de France (Vendée), pour la seconde (*Rana temporaria* L.) nous n'avons utilisé que des grenouilles d'une seule provenance (région de Nancy).

b) *Poids des animaux*. — Les animaux sont pesés avec précision; les grenouilles utilisées ont un poids compris entre 16 g. et 30 g.; on a soin de les répartir d'une manière homogène pour chaque dose injectée.

c) *Sexe*. — Nous avons utilisé indifféremment des animaux des 2 sexes, en prenant seulement la précaution de les répartir dans chaque série, aussi uniformément que possible.

d) *Nombre d'animaux expérimentés*. — Nos séries comportent au minimum 18 animaux et au maximum 30 animaux.

e) *Modalité de l'injection*. — Avant de procéder à l'injection intralymphatique, nous avons pris soin de placer les animaux pendant une heure dans de grands cristallisoirs contenant un peu d'eau et exposés à la lumière dans un endroit du laboratoire uniformément éclairé.

L'injection est pratiquée dans le sac lymphatique ventral; on enfonce l'aiguille dans la région crurale antérieure, on la dirige en haut et en dehors au-dessus de l'arcade pubienne; on a soin de ne retirer l'aiguille que lentement afin d'éviter tout écoulement de liquide par l'orifice de pénétration.

Les doses injectées sont rapportées à 10 g. de grenouille et proportionnées au poids de chaque animal. Après l'injection, les différentes séries d'animaux sont replacées dans des cristallisoirs et mises en observation pendant 18 h. On détermine à ce moment le pourcentage de mortalité, celui-ci étant d'ailleurs établi à nouveau après 24 h. et se trouvant dans la plupart des cas non modifié.

L'arrêt cardiaque est confirmé après ouverture du thorax par l'examen direct du cœur.

2) Résultats expérimentaux.

Nos essais ont été réalisés dans les conditions ci-dessus décrites avec le soluté A. Nous consignons dans les tableaux suivants les résultats obtenus sur chaque espèce de grenouille (*Rana esculenta* L. variété géographique italienne et vendéenne) et *Rana temporaria* L. (Nancy). En raison de la différence de sensibilité des deux espèces, la concentration du soluté injectable n'est pas la même; le soluté est dilué au demi pour *Rana temporaria* L., alors qu'il est employé non dilué pour *Rana esculenta*. Les résultats de nos essais sont exprimés, comme dans nos essais sur la souris, d'une part selon les modes d'expression de SABULO-NYASAKI et de TREVAN, de l'autre d'après la méthode de BEHRENS et DRAGSTEDT et LANG.

Un tableau récapitulatif permet de comparer les différents résultats obtenus

a) *Expression des résultats selon le mode de SABULO-NYASAKI.* Selon le mode de présentation de SABULO-NYASAKI nous faisons figurer pour chaque dose, le nombre d'animaux employés et le pourcentage des morts obtenues. Les tableaux suivants résument les résultats de nos essais sur *Rana Esculenta* L. (variétés italienne et vendéenne) (Tableau XIV et XV) *Rana temporaria* L. Tableau XVI.

TABLEAU XIV

Pourcentage de mortalité obtenu chez *Rana esculenta* L. (Italie)
exprimé selon le mode de SABULO-NYASAKI.

Dose en cc. pour 16 gr.	0 cc. 37	0 cc. 35	0 cc. 33	0 cc. 30	0 cc. 27	0 cc. 25	0 cc. 23	0 cc. 20
mort (+) ou survie (o) des animaux expérimentés.	+++ +++ +++ +++ +++ + 00 0 00 0 00 0 00	+++ +++ +++ +++ +++ +++ 000 000 000 000	+++ +++ +++ +++ +++ +00 000 000 000	+++ +++ +++ +++ +++ +00 000 000 000	+++ +++ +++ +++ +++ +++0 000 000 000	+++ +++ +++ +++ +++ 000 000 000 000	+++0 000 000 000 000 000 000 000 000	+00 000 000 000 000 000 000 000 000
Nombre d'animaux	30	30	30	30	30	30	6	6
de morts observé 24 h. après l'inject.	63,33	70	53,33	53,33	46,66	26,66	33,33	16,66

TABLEAU XV

Pourcentage de mortalité obtenu sur *Rana esculenta* L. (Vendée)
exprimé selon le mode de SABULO-NYASAKI.

Doses en cc. pour pour 10 g. d'animal	0 cc. 35	0 cc. 35	0 cc. 30	0 cc. 25
Mort (+) ou survie (o) des animaux expérimentés	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
	0	0	0	0
	0	0	0	0
Nombre d'animaux	18	18	18	18
°/o de morts observé 24 h. après l'inject.	77,77	88,88	66,66	55

TABLEAU XVI

Pourcentage de mortalité obtenu sur *Rana temporaria* L (Nancy)
(exprimé selon le mode de SABULO-NYASAKI.

Doses en cc. pour 10 gr. d'animal	0 cc. 15	0 cc. 10	0 cc. 07	0 cc. 05
Mort (+) ou survie (o) des animaux expérimentés	+	+	+	0
	+	+	+	0
	+	+	0	0
	+	+	0	0
	+	+	0	0
	+	0	0	0
	+	0	0	0
	+	0	0	0
	+	0	0	0
Nombre d'animaux	18	18	18	6
°/o de morts observé 24 h. après l'inject.	94,44	44,44	16,66	0

b) *Courbes de toxicité.* A l'aide de ces résultats, il est possible de construire des courbes de toxicité. La dose létale 50 trouvée sur la courbe est de : 0 cc 29 pour 10 gr. (*Rana esculenta* L (Italie) 0 cc, 225 pour *Rana esculenta* L (Vendée) et 0 cc, 105 pour *Rana temporaria* L.

Estimation de l'activité d'un soluté d'après la courbe de pourcentage.

La formule d'estimation de la toxicité que nous avons détaillée page 18 s'applique de la même façon aux dosages effectués sur la grenouille par voie lymphatique.

c) *Expression des résultats suivant BEHRENS et DRAGSTEDT et LANG.* Nous faisons figurer enfin dans les tableaux suivants la dose létale moyenne calculée suivant la formule de BEHRENS (tableau XVII) et le mode de DRAGSTEDT et LANG (tableaux XX, XXI, XXII).

TABLEAU XVII

Dose létale 50 (DM) chez *Rana esculenta* L. (Italie)
calculée selon la méthode de BEHRENS

Doses en cc. calculées pour 10 gr.	0 cc. 37	0 cc. 35	0 cc. 33	0 cc. 30	0 cc. 27	0 cc. 25	0 cc. 23	0 cc. 20
Survies	37	30	47	47	54	74	67	84
Morts	63	70	53	53	46	26	33	16
b	66.5	61.5	53	49.5	36	29.5	24.5	
a	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	
b × a	1.33	1.23	1.59	1.39	0.72	0.49	0.73	

$$DM = 0 \text{ cc. } 37 - \frac{7.48}{100} = 0, 2952 \text{ (pour 10 gr. de grenouille).}$$

$$Df = 0 \text{ cc. } 37.$$

b = la moyenne de la somme des morts pour 100 à 2 doses successives

a = la différence entre 2 doses successives.

$$m = 100.$$

TABLEAU XVIII

Dose létale 50 (DM) chez *Rana esculenta* L (Vendée)
calculée d'après la méthode de BEHRENS.

Doses en cc. calculées pour 10 gr.	0 cc. 37	0 cc. 35	0 cc. 30	0 cc. 25
Survies	18	12	34	50
Morts	82	88	66	50
b	85	77	58	
a	0.02	0.05	0.05	
b × a	1.70	3.85	2.90	

$$DM = 0 \text{ cc. } 37 - \frac{8,45}{100} = 0 \text{ cc. } 2855 \text{ (pour 10 gr. de grenouille).}$$

TABLEAU XIX

Dose létale 50 (DM) chez *Rana temporaria* L (Nancy)
calculée selon la méthode de BEHRENS.

Doses en cc. calculées pour 10 gr.	0 cc. 15	0 cc. 10	0 cc. 07	0 cc. 05
Survies	6	56	84	0
Morts	94	44	16	0
b	69	30	8	
a	0.05	0.03	0.02	
a × b	3.45	0.90	0.16	

$$DM = 0 \text{ cc. } 15 - \frac{4,51}{100} = 0 \text{ cc. } 105 \text{ (pour 10 gr. de grenouille).}$$

$$Df = 0 \text{ cc. } 15.$$

b = la moyenne de la somme des morts pour 100 à 2 doses successives,

a = la différence entre 2 doses successives.

$$m = 100.$$

TABLEAU XX

Dose létale 50, calculée chez *Rana esculenta* L (Italie)
d'après la méthode de DRAGSTEDT et LANG.

Doses en cc. calculées p. 10 gr.	Observées		Calculées	
	Survies	Morts	Survies	Morts
0 cc. 20	5	1	90	1
0 cc. 23	4	2	90	3
0 cc. 25	20	8	86	11
0 cc. 27	16	14	64	25
0 cc. 30	14	16	42	44
0 cc. 33	14	6	34	57
0 cc. 35	9	21	20	78
0 cc. 37	11	9	11	97

La dose létale 50 est de 0 cc. 30 pour 10 gr. de grenouille de cette espèce
soit 30 cc. par kg.

TABLEAU XXI

Dose létale 50 calculée chez *Rana esculenta* L (Venée)
d'après la méthode de DRAGSTEDT et LANG.

Doses en cc. calculées p. 10 gr.	Observées		Calculées	
	Survies	Morts	Survies	Morts
0 cc. 20	9	9	21	9
0 cc. 30	6	12	12	21
0 cc. 35	2	16	6	37
0 cc. 37	4	14	4	51

La dose létale 50 trouvée est 0 cc 30, pour 10 gr. de grenouille
de cette espèce, soit 30 cc. par kg.

TABLEAU XXII

Dose léthale 50, calculée chez *Rana temporaria* L (Nancy)
d'après la méthode de DRAGSTEDT et LANG).

Doses en cc. calculées pour 10 g.	Observées		Calculées	
	Survies	Morts	Survies	Morts
0 cc. 05	6	0	32	0
0 cc. 07	15	3	26	3
0 cc. 10	10	8	11	6
0 cc. 15	1	17	1	23

La dose léthale 50 trouvée est 0, cc 10 pour 10 gr. de grenouille, de cette espèce, soit 10 cc par kg.

Si l'on rapproche dans un tableau d'ensemble (XXIII), les résultats de détermination de la toxicité moyenne, selon les divers modes de calculs (TREVAN, BEHRENS, DRAGSTEDT et LANG, nous voyons que les trois modes de calculs donnent dans tous les cas des résultats très voisins. L'examen de ce tableau montre de plus la différence de sensibilité des deux espèces de grenouille. *Rana temporaria* L présente une sensibilité environ trois fois plus grande vis à vis du venin de crapaud que *Rana esculenta* L, et pour celle-ci l'origine géographique est sans importance. La constance des résultats obtenus avec chacune de ces deux espèces ne nous a pas permis de préférer l'une à l'autre.

TABLEAU XXIII

<i>Rana Esculenta</i> L (Italie) doses en cc. par kg	<i>R. Esculenta</i> (Vendée) doses en cc. par kg.	<i>R. Temporaria</i> doses en cc. par kg.
TREVAN..... 29 cc	22 cc. 50	10 cc. 50
BEHRENS..... 29cc.52	28 cc. 55	10 cc. 50
DRAGSTEDT et LANG 30 cc.	30 cc.	10 cc.

Il convient seulement, comme dans tout dosage biologique, de déterminer la toxicité d'un venin non pas en valeur absolue mais par rapport à un étalon et dans ce cas d'utiliser pour la comparaison une même espèce de grenouille.

Conclusions

1. — La méthode de perfusion lente est susceptible d'être utilisée avec succès chez le cobaye et le lapin pour le dosage biologique d'un soluté injectable de venin de crapaud. Il convient, à cet effet, de maintenir uniforme le temps d'expérience, soit vingt minutes pour le cobaye et quarante minutes pour le lapin et d'utiliser dix animaux dans le premier cas et six animaux dans le deuxième cas.

2. — La méthode statistique consistant à déterminer le pourcentage des mortalités observées pour différentes doses de venin de crapaud a été mise au point sur la souris et la grenouille. Les séries expérimentées comportent au minimum douze animaux dans le cas de la souris, et dix huit pour la grenouille.

3. — La toxicité moyenne des solutés injectables déterminée par perfusion lente dans les conditions ci-dessus précisées varie de 3 cc. 37 à 1 cc. 59 par kg. de cobaye et de 2 cc. 34 à 1 cc. 19 par kg. de lapin pour les solutés étudiés. La dose léthale moyenne par kilog chez la souris est de 30 cc. lorsqu'on utilise la voie intrapéritonéale et de 13 cc. 75 par voie intraveineuse. La dose léthale moyenne par kg. chez la grenouille est de 30 cc pour *Rana esculenta* L et de 10 cc pour *Rana temporaria* L.

II^e PARTIE

Etude de la valeur et de la précision des diverses méthodes de dosage utilisées

L'examen des résultats obtenus par les quatre méthodes de dosage biologique du venin détaillées au cours des chapitres précédents, nous a déjà permis d'apprécier leur constance et l'homogénéité des résultats obtenus.

Il reste cependant, afin de décider du choix de ces diverses méthodes, à en effectuer l'étude critique et à calculer leur précision respective.

Parmi les moyens qui permettent d'évaluer la précision expérimentale d'une méthode de dosage biologique, le premier consiste à répéter un grand nombre de fois l'essai d'une même substance médicamenteuse dans des conditions identiques. Il est évident qu'on peut considérer la méthode précise si la dose minimum mortelle ou la dose active trouvées restent voisines lorsqu'on répète les expériences. Ce procédé permet ainsi d'apprécier la grandeur des erreurs commises, en établissant la différence des résultats de chaque expérience par rapport à la moyenne de ceux-ci.

Le second moyen de contrôler la précision des méthodes de dosage consiste dans « le calcul d'erreurs » (méthode des statisticiens, appliquée par TREVAN, BURN, COWARD au dosage biologique. Cette méthode qui a fait l'objet de nombreuses critiques ne prend évidemment toute sa valeur que pour un grand nombre d'expériences, alors qu'en biologie le nombre d'essais pratiquement réalisable est forcément limité.

Dans un premier chapitre, nous avons appliqué la première méthode qui consiste à déterminer les écarts qui se produisent entre divers résultats expérimentaux, puis à titre documentaire nous avons signalé les erreurs théoriques que fournit le calcul statistique et nous les exposons dans un deuxième chapitre.

Enfin dans un dernier chapitre, nous avons comparé les résultats des toxicités d'un soluté injectable de venin déterminés par diverses méthodes avec ceux donnés par un soluté plus actif afin de voir si le rapport d'activité restait constant.

CHAPITRE I

DÉTERMINATION DES ÉCARTS EXPÉRIMENTAUX

Nous avons en premier lieu calculé les écarts expérimentaux entre les chiffres de toxicité déterminés par perfusion lente chez le cobaye et le lapin. Ces mêmes calculs ont été effectués pour les méthodes statistiques de détermination chez la souris et la grenouille.

1) Vérification de la constance des résultats fournis par la méthode de perfusion lente

a) Cobaye.

Nos différents essais effectués sur le cobaye comportent chacun une série de dix animaux. Nous avons comparé la dose mortelle moyenne (D M M) obtenue pour les cinq premiers cobayes avec celle obtenue pour les 5 autres animaux.

TABLEAU XXIV

Valeurs comparées des dosages effectués sur le cobaye

Animaux	1 ^{er} groupe D M M (en cc.)	2 ^{me} groupe D M M (en cc.)	Différence entre les 2 groupes	Différence % entre les 2 groupes
Cobaye 1 ^{re} série	2 cc. 88	2 cc. 47	0, 41	14, 23
" 2 ^{me} "	1 cc. 72	1 cc. 46	0, 26	15, 44

L'examen du tableau précédent montre que les pourcentages d'erreurs fournis par une même dose sont très voisins puisqu'ils ne dépassent pas 15 p. 100.

b) Lapin.

Les séries de lapins comportent six animaux ; nous comparons également ici les résultats obtenus pour les trois premiers animaux avec ceux donnés par les suivants et nous les faisons figurer dans le tableau XXV.

TABLEAU XXV

Valeurs comparées des dosages effectués sur le lapin.

Animaux	1 ^{er} Groupe D M M (en cc.)	2 ^{me} groupe D M M (en cc.)	Différence entre les 2 groupes	Différence % entre les 2 groupes
Lapin (1 ^{re} série	2 cc. 66	2 cc. 03	0 cc. 63	23,30
« 2 ^{me} «	1 cc. 31	1 cc. 08	0 cc. 23	17,55

Les résultats fournis par deux dosages successifs montrent que la différence est un peu plus importante que dans le cas précédent puisqu'elle oscille autour de 20 p. 100.

Elle ne dépasse cependant pas la limite qu'on observe en général pour les dosages biologiques, surtout lorsqu'on utilise un si petit nombre d'animaux.

En résumé, les résultats de toxicité par perfusion lente semblent plus constants lorsqu'on opère sur le cobaye que sur le lapin, cependant leur sensibilité reste voisine.

2) Vérification de la constance des résultats fournis par les méthodes de détermination statistique

Nous avons de la même façon que précédemment vérifié la constance des résultats fournis par les deux méthodes statistiques essayées sur la souris et la grenouille.

Souris.

Nous avons effectué les dosages comparatifs répétés à deux reprises sur la souris, en déterminant la toxicité, non seulement par voie intrapéritonéale, mais encore par voie intraveineuse. Les valeurs de ces déterminations sont résumées dans les tableaux suivants.

TABLEAU XXVI et XXVI bis

Valeurs comparées des déterminations de toxicité chez la souris
(voie intrapéritonéale)

1^{re} Série de 12 animaux.

Doses en cc. calculées pour 16 gr. d'animal	Pourcentage de morts du 1 ^{er} groupe d'animaux	Pourcentage de morts du 2 ^{me} groupe d'animaux	Différence entre les 2 groupes	Différence % entre les 2 groupes
0 cc. 55	83	83	0	0
0 cc. 50	83	83	50	60
0 cc. 48	33	66	33	50
0 cc. 45	33	16	17	51
0 cc. 35	16	33	17	51

2^{me} Série de 12 animaux.

Doses en cc. calculées pour 16 gr. d'animal	Pourcentage de morts du 1 ^{er} groupe d'animaux	Pourcentage de morts du 2 ^{me} groupe d'animaux	Différence entre les 2 groupes	Différence % entre les 2 groupes
0 cc. 55	100	83	17	17
0 cc. 48	83	50	33	39
0 cc. 35	16	0	16	16

TABLEAU XXVII

Valeurs comparées des déterminations de toxicité chez la souris
(voie intraveineuse)

1^{re} série de 12 animaux

Doses en cc. calculées pour 16 gr. d'animal	Pourcentage de morts du 1 ^{er} groupe d'animaux	Pourcentage de morts du 2 ^{me} groupe d'animaux	Différence entre les 2 groupes	Différence % entre les 2 groupes
0 cc. 24	66	66	0	0
0 cc. 23	50	83	17	39
0 cc. 22	50	50	0	0
0 cc. 21	33	50	17	34
0 cc. 20	0	33	33	33

TABLEAU XXVII bis

2^{me} Série de 12 animaux

Doses en cc. calculées pour 16 gr. d'animal	Pourcentage de morts du 1 ^{er} groupe d'animaux	Pourcentage de morts du 2 ^{me} groupe d'animaux	Différence entre les 2 groupes	Différence % entre les 2 groupes
0 cc. 22	33	50	17	34
0 cc. 21	16	16	0	0

La lecture de ce tableau permet de conclure que dans le cas de détermination de la toxicité par voie intrapéritonéale, la différence qui sépare deux résultats successifs est assez importante puisqu'elle atteint 50 et même 60 p. 100.

Par contre, pour les essais effectués par voie intraveineuse, la différence la plus considérable n'atteint que 39 pour 100.

Grenouille.

Des essais analogues ont été effectués pour la détermination des toxicités sur la grenouille.

Les tableaux ci-dessous résument les résultats obtenus sur les deux variétés de grenouilles.

TABLEAU XXVIII

Valeurs comparées des déterminations de toxicité chez la grenouille.

Rana esculenta L (Italie)

Série de 18 animaux.

Doses en cc. calculées pour 10 gr. d'animal	Pourcentage de morts du 1 ^{er} groupe d'animaux	Pourcentage de morts du 2 ^{me} groupe d'animaux	Différence entre les 2 groupes	Différence % entre les 2 groupes
0 cc. 25	33	55	22	40
0 cc. 27	55	44	11	20
0 cc. 30	22	66	44	66
0 cc. 33	66	66	0	0
0 cc. 35	77	66	11	14
0 cc. 37	55	55	0	0

TABLEAU XXVIII bis

Valeurs comparées des déterminations de toxicité chez la grenouille.

Rana Temporaria L (Nancy)

Série de 18 animaux.

Doses en cc. calculées pour 10 gr. d'animal	Pourcentage de morts du 1 ^{er} groupe d'animaux	Pourcentage de morts du 2 ^m e groupe d'animaux	Différence entre les 2 groupes	Différence % entre les 2 groupes
0 cc. 07	11	22	11	50
0 cc. 10	44	55	11	20
0 cc. 15	88	100	12	12

On constate que les différences qui séparent deux déterminations successives varient entre 12 et 60 p. 100.

CHAPITRE II

RENSEIGNEMENTS FOURNIS PAR LE CALCUL D'ERREURS

On sait que certains pharmacologues ont introduit dans le dosage biologique les règles de calculs d'erreurs empruntées aux statisticiens. Ils ont établi ainsi la réserve qu'il convient d'apporter dans les déterminations de toxicité.

Ces règles, qui se montrent précises lorsqu'on a expérimenté sur un très grand nombre d'animaux, semblent, comme l'ont signalé certains auteurs (R. HAMET, CAHEN et LAUNAY), perdre de leur intérêt dans la pratique courante où l'on doit se limiter à un nombre assez restreint d'expériences.

Cependant, afin d'être complet, nous avons cru bon d'appliquer cette règle, en renvoyant pour le détail aux publications antérieures (PICHOT et Mlle LEVY, Mlle LEVY et CAHEN, CAHEN et LAUNAY). La principale règle de calcul est l'écart individuel moyen (Standard Deviation of the Average, des auteurs anglais) : Si, à cette dose, on ajoute ou soustrait trois fois l'écart individuel moyen, on obtient la dose qui est réelle dans 369 cas sur 370 :

$$D = M \pm 3E$$

Enfin, de ce facteur, on déduit par simple calcul l'erreur maximum pour cent.

1) Ecart individuel moyen.

Le calcul de l'écart individuel moyen ou de l'écart de pourcentage est donné par la formule de TREVAN.

$$E = \sqrt{\frac{\sum D^2}{n(n-1)}}$$

dans cette formule D = l'écart entre chacune des doses minima mortelles et la dose minimum mortelle moyenne.

n = le nombre d'animaux utilisés dans l'essai

soit pour le cobaye :

$$(\text{sol A}) E = \sqrt{\frac{6.972}{10(10-1)}} = 0.733$$

$$(\text{sol B}) E = \sqrt{\frac{3.902}{10(10-1)}} = 0.41$$

soit pour le lapin :

$$(\text{sol A}) E = \sqrt{\frac{1.892}{6(6-1)}} = 0.345$$

$$(\text{sol B}) E = \sqrt{\frac{0.692}{6(6-1)}} = 0.394$$

2) Erreur maximum pour 100.

TREMAN a proposé de calculer l'erreur maximum pour 100 d'après la formule suivante,

$$\text{Erreur maximum pour 100} = \frac{300 E}{M}$$

dans laquelle E représente le résultat précédent et M la dose mortelle.

TABLEAU XXIX

Renseignements fournis par le calcul d'erreur pour la méthode de perfusion lente chez le cobaye et chez le lapin.

Animaux utilisés	Ecart indiv. moyen	3 E	Dose min. mort. moy. de 369/370 M + 3 E	Erreur max. p. 100 $\frac{300 E}{M}$
Cobaye	Sol. A 0.733	2.199	2.67 + 2.199	82.35
	Sol. B 0.41	1.23	1.59 + 1.023	77.35
Lapin	Sol. A 0.345	1.035	2.34 + 1.035	44.23
	Sol. B 0.394	1.182	1.19 + 1.182	74.33

L'examen des résultats de ce tableau montre que les erreurs maximas pour 100 varient de 77 à 82 pour le cobaye et de 44 à 74 pour le lapin.

Nous aurions pu répéter ces calculs dans le cas des méthodes statistiques, mais il semble, comme l'ont montré CAHEN et LAUNAY, que ce mode de calcul n'offre que peu d'intérêt ; aussi ne l'avons nous pas fait figurer dans ce travail

CHAPITRE III

COMPARAISON DES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES DIVERSES MÉTHODES

Etant donné la diversité des méthodes et des espèces animales utilisées dans nos expériences, nous avons cru bon de grouper dans un tableau d'ensemble les résultats obtenus pour les deux solutés étudiés : A et B.

Le premier soluté a été essayé à la fois par les méthodes de perfusion et les méthodes statistiques ; le deuxième a été examiné seulement par la technique de perfusion lente sur le cobaye et de lapin.

Nous faisons figurer dans le tableau suivant les chiffres des doses mortelles minima par kg de cobaye et de lapin, et ceux des doses léthales pour 50 pour cent des souris et des grenouilles, rapportés également au kg d'animal. Dans ce dernier cas, nous avons groupés les résultats obtenus d'après les divers modes de calcul de TREVAN, de BEHRENS et de DRAGSTEDT et LANG.

TABLEAU XXX et XXX bis

Valeurs comparées des déterminations effectuées par perfusion lente et par méthodes statistiques

Méthode de perfusion lente (soluté A)

Doses minima mortelles moyennes par kg	Cobaye	Lapin
	2 cc. 67	2 cc. 34

Méthodes statistiques (soluté A)

Souris

(doses léthales 50 par kg)

Grenouilles

(doses léthales 50 par kg.)

Modes de calculs de :	Voie intrapéritonéale	Voie intraveineuse	Voie lymphatique	
			Rana esculenta L (Italie)	Rana temporaria L (Nancy)
TREVAN	30 cc.	13 cc. 75	29 cc.	10 cc. 50
BEHRENS	28 cc.	13 cc.	29 cc. 52	10 cc. 50
DRAGSTEDT et LANG	30 cc.	13 cc.	30 cc.	10 cc.

Ainsi le cobaye et le lapin sont également sensibles au venin de crapaud et beaucoup plus sensibles que la grenouille *R. temporaria* et surtout que la souris. Dans le cas des perfusions lentes nous avons déterminé les toxicités de deux solutions différentes A et B et nous avons effectué la comparaison d'activité de ces deux solutions. Les chiffres sont indiqués dans le tableau suivant. (XXXI).

TABLEAU XXXI

Valeurs comparées de deux solutés A et B

	Cobaye	Lapin
Solution B	100	100
Solution A	59	50

Nous voyons que, calculée par rapport à un soluté B, l'activité du soluté A varie entre 50 et 59 p. 100, selon l'animal d'expérience.

Conclusions

1. — La méthode de perfusion lente expérimentée chez le cobaye et chez le lapin donne des résultats suffisamment constants et homogènes pour être appliquée au dosage biologique du venin de crapaud. La vérification de la constance des résultats montre que le pourcentage d'erreurs ne dépasse pas 15 p. 100 pour le cobaye, et 20 p. 100 pour le lapin.

L'écart individuel moyen est de 0,41 à 0,73 dans le cas du cobaye et de 0,345 à 0,394 chez le lapin. L'erreur maximum calculée théoriquement suivant les règles de TREVAN est de 77 à 82 pour 100 pour le cobaye et 44 à 74 pour cent pour le lapin.

En définitive, la méthode de perfusion lente fournit des résultats plus constants lorsqu'on utilise le cobaye que lorsqu'on utilise le lapin.

2. — Parmi les méthodes statistiques envisagées, nous devons considérer la constance des résultats acquis chez la souris par voie intrapéritonéale et par voie intraveineuse et chez la grenouille par voie lymphatique abdominale. La comparaison des résultats montre que la méthode de toxicité chez la souris par voie intrapéritonéale est moins fidèle que celle qui utilise la voie intraveineuse. Les résultats obtenus dans ce dernier cas sont comparables à ceux obtenus chez la grenouille *Rana esculenta* L et *Rana temporaria* L. De ces méthodes, celle qui utilise la grenouille a l'avantage d'être plus simple et plus économique.

III^e partie

Etude de la préparation et de la valeur d'un étalon

Les résultats obtenus précédemment ont montré que non seulement on pouvait doser le venin de crapaud par des méthodes biologiques mais que ces méthodes offraient une précision satisfaisante. Cependant, pour qu'un dosage biologique ait une valeur certaine, il est nécessaire de comparer l'activité du produit étudié par rapport à celle d'un produit choisi comme étalon. Or, jusqu'à présent, les auteurs qui ont étudié ce venin n'ont pas abordé la question de l'étalon destiné à servir d'élément de référence pour le dosage.

Parmi les diverses substances susceptibles d'être envisagées comme tel, on pouvait *a priori* songer à un produit cristallisé, mais la pharmacologie et la thérapeutique ont montré aussi bien pour les drogues animales que pour les drogues végétales que le « totum » présente une activité très différente de celle des principes actifs qu'il renferme ; c'est ainsi que la digitaline diffère de la digitale (POUCHET), la caféine diffère de la kola (GORTS), le scillairène de la scille (CABEN et LACNAV), la folliculine de l'ovaire.

De plus, dans le cas particulier du venin de crapaud, les divers produits isolés d'une même sécrétion (*Bufo vulgaris* L.) varient selon les auteurs, et l'on peut citer : la bufotaline et la bufoténine (PHISALIX et G. BERTRAND) la bufonine et la bufotaline (FAUST), la bufotaline (WIELAND et WEIL), la bufoténine (HANDOWSKY), la bufotoxine (WIELAND et ALLES) la vulgaro-bufotoxine et la vulgaro-bufoténine (CHEN K. K., JENSEN H., LING CHEN A.)

A priori, il semble donc que l'on ne puisse choisir, pour servir d'étalon, l'un de ces produits, sans une étude systématique approfondie. C'est pour quoi, dans le choix d'un étalon des préparations de venin de crapaud, c'est une préparation galénique se montrant aussi constante que possible que nous avons adoptée.

Dans les chapitres qui vont suivre, nous envisagerons successivement l'étude de la préparation de l'étalon, le contrôle de la stabilité de celui que nous avons utilisé dans nos recherches.

CHAPITRE I

ÉTUDE DE LA PRÉPARATION DE L'ÉTALON

L'étalon utilisé dans nos dosages est essentiellement un macéré aqueux désalbuminé du produit de la sécrétion des glandes parotides de *Bufo vulgaris* L.. Voici brièvement résumées les diverses phases de la préparation de cet étalon.

1) Anesthésie des crapauds.

Les crapauds, après avoir été soigneusement lavés plusieurs fois, sont disposés par centaine, dans des récipients métalliques fermés par un couvercle auquel est fixé un tampon imbibé d'éther. On laisse séjourner les animaux dans cette atmosphère pendant 20 minutes, ce qui suffit à les amener à un stade d'anesthésie suffisant pour l'opération ultérieure.

2) Expression de la sécrétion des glandes parotoïdes.

Au moyen d'une pince spéciale dont la courbure épouse la forme de la glande, on exprime le contenu des glandes parotides : le venin projeté sous l'aspect d'un liquide crémeux, couleur chamois, est recueilli dans de petits bacs de verre contenant un volume connu d'eau distillée.

On enrichit ainsi l'eau en venin jusqu'à saturation ; le produit ne se dissout que très partiellement dans l'eau et il s'agglomère rapidement en masses compactes qui tombent au fond du bac. Les suspensions sont réunies au fur et à mesure de leur production dans une grande cuve de verre où elles sont brassées énergiquement pendant une demi-heure à l'aide d'agitateurs électriques. Sous l'influence du contact de l'air pendant l'extraction et le brassage le produit présente maintenant une coloration brune.

3) Stérilisation de la solution-mère.

Sans filtrer ni décantier la préparation, on répartit celle-ci en ampoules d'un litre qui sont tyndallisées pendant trois jours à une température de 55°. Ces ampoules dites ampoules-mères se présentent sous forme d'un liquide opaque, de couleur brune, d'odeur particulière, de réaction acide, de conservation et d'activité presque indéfinies.

4) Préparation d'un soluté injectable.

Pour les essais biologiques, la préparation est diluée et rendue isotonique par addition de soluté physiologique légèrement hypertonique. On filtre sur bougie de porcelaine et on répartit en ampoules qu'on stérilise à nouveau par tyndallisation à 55°.

5) Choix de l'étalon.

La technique ci-dessus décrite a été suivie pour la préparation des deux solutés. L'un de ces solutés, le soluté B possède une toxicité plus élevée que celle de l'autre, le soluté A. Déterminée par la méthode de perfusion lente, la toxicité du soluté A, chez le lapin, n'atteint que 50 pour 100 de la toxicité du soluté B et chez le cobaye 59 pour 100 de la toxicité de ce même soluté. Adoptant le principe directeur de l'étalonnage biologique des médicaments, nous avons choisi comme étalon la préparation la plus concentrée, soit le soluté B.

CHAPITRE II

TITRE ÉVENTUEL DES PRODUITS COMMERCIAUX

Les deux solutés que nous avons étudiés au cours des précédents chapitres sont très concentrés et, dans la pratique courante, il semble qu'il soit possible d'utiliser des produits beaucoup plus dilués.

Actuellement, le nombre des préparations à base de venin de crapaud est tellement limité, aussi bien en France qu'à l'Etranger, qu'il est difficile de fixer le titre qu'il conviendrait d'exiger d'une telle préparation.

Nous n'avons pas envisagé ce problème, nous bornant à titre de documentation, à comparer chez la souris la toxicité du soluté A à celle d'un soluté utilisé en clinique. Avec ce dernier soluté 4 cc. seraient nécessaires pour tuer un animal d'un poids moyen de 16 g., soit 250 cc. pour tuer un kg de souris. Ce soluté a donc une activité de 250 : soit environ 8 fois moins grande que celle du soluté A.

CHAPITRE III

STABILITÉ DE L'ÉTALON

Pour que cette étude de l'étalonnage du venin de crapaud soit complète, un dernier point restait à envisager : celui de la stabilité d'une préparation susceptible de servir d'étalon. Dans ce but, nous avons conservé pendant un an à la température de 0°, un lot d'ampoules de même origine que celle dont nous avons étudié la toxicité, et nous avons répété cette détermination sur le cobaye et la souris après cette année de conservation.

Nous faisons figurer dans le tableau suivant les résultats obtenus :

TABLEAU N° XXXI et XXXI bis

Comparaison de la toxicité du soluté de venin de crapaud chez le cobaye et la souris après un an de conservation.

		Avril 1937	Mai 1938	Différence %
Doses mortelles en cc. par kg. de cobaye.....		3 cc. 37	2 cc. 67	14,5

Doses mortelles en cc. par kg de souris		Pourcentages de morts		
		Avril 1937	Mai 1938	Différence %
Voie intrapéritonéale	34 cc. 37	50	50	0
	30 cc.	40	50	10
	21 cc. 87	25	5	20
	13 cc. 75	50	50	0
Voie intraveineuse	13 cc. 12	41	20	21

Ainsi les résultats des toxicités déterminées par trois méthodes différentes : perfusion lente chez le cobaye, pourcentage de mortalité chez la souris par voie intrapéritonéale et par voie intraveineuse, sont dans la plupart des cas très voisins. Il semble donc que la stabilité de la préparation de venin considérée soit suffisante pour que celle-ci puisse constituer un étalon.

Conclusions

1. — Pour servir d'élément de référence au dosage biologique du venin de crapaud, il a été constitué un étalon préparé par macération aqueuse du produit de sécrétion des glandes parotides de *Bufo Vulgaris*. L. (= *Bufo bufo* L.).

2. — La toxicité de cet étalon qui est la plus active des préparations expérimentées déterminée par perfusion lente en un temps environ de 20 minutes chez le cobaye est de 1 cc. 5g par kg d'animal.

3. — La stabilité de l'étalon semble satisfaisante pendant une durée d'au moins une année, la toxicité chez le cobaye et la souris ne semblant pas modifiée après cet intervalle de temps.

Conclusions générales

Dans ce travail, consacré à l'étude du dosage biologique du venin de crapaud, nous avons envisagé la mise au point des méthodes de dosage de ce venin, la valeur et la précision des diverses méthodes employées, enfin, le choix d'un étalon destiné à servir d'élément de référence au titrage des préparations.

Les conclusions sont les suivantes :

1. — Etude expérimentale des méthodes de titrage biologique du venin de crapaud.

1) Méthodes de perfusion lente.

a) La méthode de toxicité cardiaque obtenue par perfusion lente, peut être appliquée au dosage biologique du venin, en utilisant comme animaux d'expérience le cobaye et le lapin, anesthésiés à l'uréthane et non soumis à la respiration artificielle

b) Les résultats ainsi obtenus sont constants à condition de pratiquer une perfusion lente, en un temps voisin de vingt minutes pour le cobaye et de quarante minutes pour le lapin.

2) Méthodes statistiques.

La méthode de dosage basée sur la toxicité consiste à déterminer, par injection unique, le pourcentage de mortalité obtenu pour chaque dose de venin. Elle peut être utilisée sur la grenouille par voie lymphatique et sur la souris par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. On doit utiliser au minimum dix-huit animaux dans le premier cas, et douze dans le deuxième.

II. Valeur et précision des diverses méthodes expérimentées.

1. — Parmi les méthodes de perfusion lente, la méthode la plus fidèle, la plus économique, est celle qui utilise comme animal d'expérience le cobaye.

2. — Parmi les méthodes statistiques, les deux méthodes de choix, pour leur commodité et leur précision, sont celles qui déterminent le pourcentage de mortalité chez la grenouille *Rana temporaria* L ou *Rana esculenta* L, et chez la souris par voie intraveineuse, la technique par voie intrapéritonéale pratiquée chez celle-ci semblant moins fidèle.

III. — Préparation et valeur d'un étalon destiné au dosage des préparations de venin de crapaud

1. — L'étalon utilisé dans nos expériences est constitué non par un principe actif cristallisé, mais par une préparation galénique obtenue par macération aqueuse de la sécrétion des glandes parotides de *Bufo vulgaris*. L.

2. — La toxicité de cet étalon déterminée par perfusion lente en un temps voisin de 20 minutes est de 1 cc. 59 chez le cobaye.

3. — Cet étalon présente une stabilité parfaite pendant au moins une année.

Vu :

Le Président de la Thèse,
Albert GORIS.

Vu :

Paris, le 8 mars 1940
Le Doyen de la Faculté,
A. DAMIENS.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE

- ABEL J. J. et MACHT D. I. — The poisons of the tropical toad *Bufo Agua*. *Journ. Am. Med. Association*, 1911, Tome 56, p. 1531.
- Idem* : Two crystalline pharmacological Agents obtained from the tropical toad *Bufo aqua*. *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 1911-1912, tome 3, p. 31.
- BEHRENS B. — Zur Anwertung der Digitalisblätter im Frochversuch. *Arch. f. exper. Path. und Pharm.*, 1929, tome 140, p. 237.
- BELLINI, LEANDRO et ARDY C. — Azione dell'adrenalina e del veleno di *Bufo vulgaris*, L. primo e dopo somministrazione di un farmaco simpaticolitico, 933 F. *Biochimica e Ter. sper.* 1936, tome 23 p. 369, 373
- British Pharmacopeia* : Biological assay of powdered digitalis. 1932 app. XV, I, London.
- BURN J. H. — Methods of biological assay, *Oxford medical publications* 1928.
- Idem* : Some methods of biological assay, *Pharm. Jour.* 1926, tome 117, p. 576-579.
- BURN J. H. et TREVAN J. W. — The standard for the biological assay of strophanthus, together with a report on the assay by the frog method. *Pharm. Journ.*, 1926, p. 117, 439.
- CAHEN R. — Dosage et étalonnage biologique de quelques glucoside cardiotoxiques (ouabaine, digitaline, scillarène, cymarine), *Thèse Doct. Pharm.*, 1930, Paris, Imp. Cour d'Appel.
- CAHEN R. et LAUNAY L. — Activité comparée des préparations aqueuses et alcooliques de Scille. *J. P. C.*, 1936, tome 23, p. 305.
- Idem* : Sur la spécificité d'un étalon des préparations de Scille. *J. P. C.*, 1906 tome 23, p. 305.
- Idem* : Méthodes statistiques de dosage biologique de la Scille. *Bull. de l'Ac. de Med.*, 1930, p. 115, n° 28.
- CHEN K. K., JENSEN H., et LING CHEN A. — The pharmacological action of the principles isolated from Ch'An Su, the dried venom of the chinese toad. *Journ. Pharm. and. Exper. Therap.*, 1931, tome 43, p. 13.

- Idem* : The physiological action of the principles isolated from the secretion of the common european toad (*Bufo, bufo, bufo*) *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 1931, tome 47, p. 307.
- Idem* : The physiological action of the principles isolated from the secretion of the european green toad (*bufo viridis*). *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 1933, tome 49, p. 14.
- CHEN K. K. et LING CHEN A. A. — Similitary and Dis-similitary of Bufagins, Bufotoxins, and digitaloid Glucosides. *Journ. Pharm. and. Exper. Therap.* tome 49, p. 561.
- CUSHNY A. R. — Cité par MUNCH J. C. *Bioassays*, 1931 p. 363.
- DALE H. — Standardisation des substances thérapeutiques. Note présentée par Sir Henry Dale à la S. D. N. *Bull. Sc. Pharm.*, 1927, p. 177.
- DEJEAN E. — Etude pharmaco-chimique comparée sur la digitale sauvage la digitale cultivée et les digitalines. *Thèse Doct. Pharm.*, 1906 Montpellier.
- DRAGSTEDT C. A. et LANG V. F. — Respiratory stimulants in acute cocaine poisoning in rabbits. *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 1928, tome 32, p. 215.
- EPSTEIN D. et GUNN J. W. C. — The action of the parotid gland secretion of *Bufo regularis*. *Journal Pharm. and Exper. Therap.*, 1930, tome 39, p. 1.
- FAUST E. S. — Über Bufonin und Bufotalin, die wirksamen Bestandtheile des Krötenhautdrüsen sekretes. *Arch. f. Exper. Pathol. und Pharmak.*, 1902, tome 39 p. 1.
- FORNARA D. — Sur les effets physiologiques du venin de crapaud. *Journal de Ther.*, 1877, tome 4, p. 882.
- FOCKE C. — Ist ein stärkerer gleichmässiger Wirkungswert des offiziellen *Bulbus scillae* erreichbar und wünschenswert. *Arch. der Pharmacie*, 1927, tome 265, p. 91, 96.
- GAUTRELET J. — Eléments de Technique physiologique. p. 14, 254. *Masson et Cie*, éditeurs,
- GESSNER O. — Über die Wirkung des krotengiftes auf das isolierte Kaltblüterherz. *Arch. f. Exper. Pathol. und Pharmak.*, 1926, tome 114, p. 218-239 tome 118, p. 325.
- GORIS A. — Sur un nouveau principe cristallisé de la Kola fraîche. *C. R. Ac. Sc.*, 1907, tome 144, p. 1162.
- HAMET R. — A propos de l'essai physiologique des digitaliques. *Bull. Sc. Pharm.*, 1934, tome 4, p. 161, 164.
- HANDOWSKY H. — Ein Alkaloid in gifte von *Bufo vulgaris*. *Arch. f. Exper. Pathol. und Pharmak.*, 1920, tome 86, p. 138
- HATCHER R. A. et BRODY J. G. — The biological standardization of drugs. *Am. Journ. of Pharmacy*, 1910, tome 82, p. 360, 37.

- KAERBER G. — Beitrag zur Kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. f. Exper. Pathol. und Pharmak.*, 1931, tome 162 p. 480.
- KNAFF-LENZ E. — The physiological assay of preparations of digitalis. *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 1926 tome 29, p. 407.
- KROCH. — cité par MUNCH, *Bioassays*, 1931, p. 362.
- LAUNAY L. — Contribution au dosage et à l'étalonnage biologique de la scille. *Thèse Doct. Pharm.* 1938, Paris, Vigot.
- LAUNAY L. — Notions de pharmacodynamie, Leçons sur la toxicité. Imp. «J. D. Baillière et fils, Paris.
- LEVY et CAHEN R. — Dosage biologique et étalonnage de quelques glucosides cardiotoniques, ouabaine, digitaline, scillarene, cymarine. *Bull. Sc. Pharm.* 1931, tome 38, p. 85.
- LEVY J. et OTTERSTRÖM K. — Dosage biologique des cardiotoniques. Toxicité d'un étalon national de poudre de digitale par rapport à l'étalon international. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, Paris 1934, tome 16, p. 1518.
- LEVY J. et PICHOT H. — Dosage biologique de la digitale par la méthode de HATCHER-MAGNUS appliquée au chien. *Bull. Sc. Pharm.*, 1929, tome 36, p. 693.
- LUTEMBACHER. R. — Action sur le cœur du venin de crapaud, 1938. *Presse médicale* n° 80, p. 1469.
- MACHT J. J. et ROWTREE. — Cités par Abel et Macht. *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 1911, tome 3, p. 319.
- MUNCH J. C., *BIOASSAYS*. — 1931, p. 360, London.
- NOVARO V. — Toxicidad del veneno del sapo comun *Bufo marinus* para el hombre y diversos animales. *Revista de la asociacion medica argentina*, vol. 35.
- Idem* : Action pharmacodynamique du venin de crapaud. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, tome 38, p. 371.
- NIRI W. et DUROIS L. — Experimental studies on heart tonics. II The application of biometric methods to digitalis standardization. *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 1930, tome 39, p. 99, 109.
- ÖTTERSTRÖM K. — Contribution à l'étude des dosages biologiques des cardiotoniques. *Thèse Doct. Pharm.* (Université), 1936, Paris, Vigot.
- PERREIRA J. R. — Sobre a accao physiologica do veneno do sapo. *Journ. dos clinica*, 1926.
- PERREIRA J. R. et MORAES A. — Sur l'action vaso-constrictrice du venin de crapaud. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, tome 105, p. 112.
- PHARMACOPEE FRANCAISE. (Digitale), 6^e Edition, 1937, p. 270.

- PHISALIX C. et BERTRAND G. — Recherche sur la toxicité du sang du crapaud commun, *Arch. de Physiol. norm. et Path.*, 1893 t. 5, p. 541, 517.
- PHISALIX C. et BERTRAND G. — Toxicité comparée du sang et du venin du crapaud, considéré au point de vue de la sécrétion interne des glandes cutanées de cet animal. *C. R. Soc. Biol.*, 1893, tome 45, p. 477.
- Idem* : Sur les principes actifs du venin de crapaud commun (*Bufo Vulgaris L.*) *C.R. Soc. Biol.*, 1902, tome 54, p. 932. *Bull. Sc. pharm.*, 1902, tome 5, p. 241.
- PHISALIX Marie. — Animaux et venins. *Masson*, 1932, tome 2, p. 130.
- Idem* : Action physiologique des venins. *Revue de path. comparée*, 1938, tome 38, p. 774, 783.
- PIEROTTI F. G. — Ricerche sperimentale sul veleno di rospo e la sua azione fisiologica. *Monog. Pisa*, 1906. *Arch. italiana Biol.*, 1906, tome 46, p. 97, 130.
- RAPSON C. N. et UNDERHILL S. W. F. — L'utilisation des lapins dans les essais de strophanthus et de scille. *Quart. Journ. of pharm. and pharm.*, 1935, tome 8, p. 409.
- REGNIER J., LAMBIN S. et SZOLLOSI E. — Données générales sur la mesure, le calcul, et l'expression du pouvoir toxique des substances médicamenteuses. *Journ. de Physiol. et Pathol. gen.*, juin, septembre, 1937, tome 35, p. 329, p. 65.
- ROWE. — Notes on digitalin standardization. *Journ. Am. Pharmacy. A.*, 1928, tome 17, p. 645.
- SABULO-NYASAKI. — Über die Verwendbarkeit Rizinusols als Abführmittel nach der Verabfolgung von Filixpräparaten. *Arch. f. Exper. Pathol. und Pharm.*, 1929, tome 145, p. 217.
- SHIMIZU S. — Pharmacological and chemical studies on Senso, the dried venom of the chinese toad. *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 1916, tome 8, p. 347, 384.
- STERN. — Cité par MUNCH J. G., *Bioassays*, 1931, p. 364.
- SZOLLOSI E. — Etude des variations de la toxicité de la novocaïne et de la morphine en fonction des acides qui les salifient. *These Doct. Med.*, 1936, Paris.
- TIFFENEAU M., LEVY J., PICHOT H. — Dosage biologique de la digitale. *Paris, Med. An.*, 1928, tome 24, p. 562.
- TREVAN J. W. — The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Soc.*, 1927, tome 101, p. 483.
- TREVAN J. W., BOOCK, BURN J. H., and GADDUM J. H. — The pharmacological assay of digitalis by different methods. *Quart. Journ. of Pharm.*, 1928, p. 4, 6, 22.

- VELLARD J., VIANNA M. — Recherches expérimentales sur le venin du *Bufo marinus* du Brésil. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, tome 106, p. 368.
- VIALLI M. — Ricerche preliminari sul veleno secco di *Bufo Vulgaris* in toto. *Arch. di Fisiol.*, 1936, tome 35, p. 356, 361.
- Idem* : Azione del veleno di *Bufo vulgaris* sull' occhio isolato di Rana. *Boll. di Soc. med. chir.*, 1936, Pavia, tome 50, p. 367, 371.
- VULPIAN. — Sur le venin du crapaud commun. *C. R. Soc. Biol.*, 1854, tome 1, p. 133.
- VULPIAN. — Etude physiol. des venins du crapaud, du triton et de la salamandre terrestre. *C. R. Soc. Biol.*, 1856, p. 125, 138.
- Idem* : Notes relatives à l'action du venin des batraciens venimeux sur les animaux qui le produisent. *C. R. Soc. Biol.*, 1864, tome 26, p. 188, 191.
- WIELAND H. et WEIL F. S. — Über das Krötengift. *Ber., deut. chem. Gesell.*, 1913, tome 46, p. 3315.
- WIELAND H. — *Sitzungsb. Bayer Akad. Wissenschaft*, 1920, p. 329.
- WIELAND H. et ALLES R. — Über den Giftstoff der Kröte. *Ber. deut. chem. Gesell.*, 1922, tome 55, p. 1789.
- WIELAND H., HESS G. et MITTASCH H. — Über basische Inhaltsstoffe des Hautsekretes der Kröte. *Ber. deut. chem. Gesell.*, 1931, tome 64, p. 2099.
- WITHERING W. — Account of foxglove and some of its uses. 1785.
- XAVIER A. A., VELLARD V., VIANNA M. — Action du venin parotidien de *Bufo paracnemis* sur la pression artérielle, la fréquence du pouls et la respiration chez le chien. *C. R. Soc. Biol.*, tome 108, p. 1082, 1088.
- ZUMMET et DUBOIS-FERRIERE A. — Glutathion réduit et vitamine C dans le venin granuleux du crapaud *Bufo vulgaris*. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, tome 3, p. 684.
-

TABLE DES MATIÈRES

Introduction.	VI
-----------------------	----

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE QUELQUES MÉTHODES DE DOSAGE BIOLOGIQUE DU VENIN	1
Chapitre I. — Origine, nature et procédés d'extraction des divers venins de crapaud	4
Chapitre II. — Méthodes de détermination de la toxicité du venin par perfusion lente	7
I) Perfusion lente chez le cobaye.	7
II) Perfusion lente chez le lapin	11
Chapitre III. — Méthodes statistiques de dosage biologique du venin . .	14
I) Méthode statistique de toxicité chez la souris	15
II) Méthodes statistiques de toxicité chez la grenouille	26
Conclusions.	34

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA VALEUR ET DE LA PRÉCISION DES DIVERSES MÉTHODES DE DOSAGE UTILISÉES.	35
I) Détermination des écarts expérimentaux	36
II) Renseignements fournis par le calcul d'erreur.	41
III) Comparaison des résultats fournis par les diverses méthodes . .	43
Conclusions	44

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA PRÉPARATION ET DE LA VALEUR D'UN ÉTALON.	45
I) Etude de la préparation et du choix	46
II) Titre éventuel de produits commerciaux	48
III) Stabilité de l'étalon	49
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	51
BIBLIOGRAPHIE	53

SOCIÉTÉ DE L'IMPRIMERIE HABAUZIT Aubenas (Ardèche)
